

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**BIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Aniba*  
spp. (Lauraceae) DA AMAZÔNIA PARA O DESENVOLVIMENTO  
DE NOVOS ANTIMICROBIANOS**

**EMILY MARCELE SOARES SILVA**

**MANAUS - AM  
2019**

**EMILY MARCELE SOARES SILVA**  
**Bióloga**

**BIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Aniba*  
spp. (Lauraceae) DA AMAZÔNIA PARA O DESENVOLVIMENTO  
DE NOVOS ANTIMICROBIANOS**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multi-  
Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, como  
requisito parcial à obtenção do título de Doutor em  
Biotecnologia.**

**Orientadora: Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi**

**Co-orientador: Dr. Valdir Florencio da Veiga Junior**

**MANAUS – AM**  
**2019**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586b Silva, Emily Marcele Soares  
Bioprospecção de metabólitos secundários de Aniba spp.  
(Lauraceae) da Amazônia para o desenvolvimento de novos  
antimicrobianos / Emily Marcele Soares Silva . 2019  
136 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Patrícia Puccinelli Orlandi  
Coorientador: Valdir Florencio da Veiga Junior  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do  
Amazonas.

1. Bioautografia. 2. Bactérias. 3. Microscopia eletrônica. 4.  
Estirilpironas. 5. Ácido furanacético. I. Orlandi, Patrícia Puccinelli. II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

*Dedico*

*À minha mãe Maria Elcy Oliveira Soares,  
por todo amor, proteção e dedicação a  
mim e à minha irmã Evelyn Soares.*

*Ofereço*

*A Deus, por sempre ser a minha  
força e o meu acalento nos  
momentos difíceis e por ter sido  
tão generoso comigo.*

## **Agradecimentos**

Agradeço,

A **Deus**, em primeiro lugar, pois nada acontece sem Sua permissão.

À **Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi**, pelo aceite em ser minha orientadora, pela confiança depositada e por proporcionar parcerias e recursos para a execução de experimentos.

Ao **Dr. Valdir Florencio da Veiga Junior**, pela orientação em grande parte do projeto, por ter proporcionado parcerias para o desenvolvimento da tese e por todo o auxílio e conhecimentos passados durante o Doutorado.

Ao **Dr. Celso Vataru Nakamura** e à **Dra. Tânia Ueda Nakamura**, pela parceria, por terem fornecido recursos e estrutura para a execução de parte dos experimentos, e por terem me recebido tão bem em seu laboratório.

Ao **Dr. Raimundo Braz Filho**, pela ajuda na elucidação estrutural de moléculas.

A todos do grupo **Química de Biomoléculas da Amazônia – QBIOMA**, da Universidade Federal do Amazonas, pela amizade, por toda a parceria, em especial à **MSc. Yasmin Cunha**, que compartilhou comigo toda a sua experiência em cromatografia e isolamento de substâncias.

Ao grupo do **Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos**, da Universidade Estadual de Maringá, pela cordial recepção. Agradeço em especial à **Dra. Jéssica Carreira** e à **Dra. Danielle Lazarin Bidóia** por toda a ajuda, auxílio e conhecimento compartilhado na execução dos experimentos.

A todos do grupo de **Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas da Amazônia – DCDIA**, do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/FIOCRUZ), especialmente à **MSc. Ivanildes Bastos** e **BSc. Dandara Brandão**, por toda a ajuda prestada durante meus experimentos na Fiocruz.

À toda equipe técnica da **Plataforma de Bioensaios Biotecnológicos** e da **Plataforma de Citometria de Fluxo**, da Fiocruz Amazônia, pela realização de parte dos experimentos.

Ao **Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia**, o qual me deu esta oportunidade, e a todos os **professores**, que lecionaram para mim na Pós-graduação, por enriquecerem meus conhecimentos.

À **FAPEAM** e ao **CNPq** pelo financiamento de minha bolsa de estudos e do projeto.

Aos **colegas** Davi, Gláucia, Larissa, Milena, Isadora, Simone e todos os demais colegas de laboratório, pela amizade e por terem tornado os dias de Doutorado mais leves.

À minha **família**, que sempre torceu por mim, em especial à minha **mãe** e minha **irmã**.

Ao meu marido, **Andrew Pacífico**, por tantos anos de amor e companheirismo e por ter sido um dos meus maiores incentivadores na minha vida acadêmica.

A todos que me ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho. Muito obrigada!

## RESUMO

Devido à disseminação de linhagens multirresistentes e limitações dos fármacos disponíveis no mercado para o tratamento de doenças infecciosas, estudos que visam a busca por moléculas que possam servir para o desenvolvimento de novas drogas são imprescindíveis. Plantas do gênero *Aniba* são relatadas produzir metabólitos secundários de classes químicas conhecidas por suas bioatividades. O objetivo do presente trabalho foi realizar estudo fitoquímico de extratos etanólicos bioativos de *A. panurensis*, *A. parviflora* e *A. ferrea*, para o isolamento de substâncias bioativas. Os extratos etanólicos e fases de partição líquido-líquido foram testados contra 23 bactérias gram-negativas, 9 bactérias gram-positivas e contra o parasita *Plasmodium falciparum* (linhagem FRC3). As substâncias isoladas foram testadas quanto à sua atividade antibacteriana, antifúngica, anti-*Plasmodium*, antichagásica e anti-*Leishmania*. Os extratos etanólicos e fases Hex e CHCl<sub>3</sub> de folhas e galhos de *A. panurensis* exibiram boa atividade frente às bactérias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus simulans*, *Staph. aureus*, *Staph. aureus* resistente à metilicina (MRSA) e *Streptococcus mutans* ( $7,8 \leq \text{CIM} \leq 250 \mu\text{g/mL}$ ). As fases de partição bioativas foram submetidas a ensaios de bioautografia e a fase CHCl<sub>3</sub> de galhos de *A. panurensis* foi selecionada para o fracionamento químico bioguiado pela mesma técnica. A cromatografia em coluna Flash foi utilizada para o isolamento das substâncias, que foram identificadas por métodos espectrométricos e espectroscópicos como: 5,6 dehidrokawaina (substância 1); 4-metoxi-11,12-metilenodioxido-6-trans-estiril-pirano-2-ona (substância 2); 6,6'-(2,4-Bis(3,4-dimetoxifenil)ciclobutano-1,3-diil)bis(4-metoxi-2H-piran-2-ona) (substância 3); e 2-Ácido Furanacético, 4-dodeciltetrahidro-5-oxo-, (substância 4). Apenas a substância 4 exibiu atividade antibacteriana, com CIM de 7,8  $\mu\text{g/mL}$  para as linhagens estafilocócicas, 125  $\mu\text{g/mL}$  para *B. subtilis* e 31,25  $\mu\text{g/mL}$  para *Strep. mutans*. O teste de curva de morte mostrou comportamento bactericida da substância 4 na concentração 4,0 x CIM frente à *Staph. aureus* e MRSA, em 12 horas e 9 horas, respectivamente. Frente à *Strep. mutans*, a substância 4 foi bactericida na sua CIM correspondente no período de 6 horas. Os modos de ação antibacterianos da substância 4 foram avaliados através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Transmissão (MET), onde foi possível observar separação do citoplasma da parede celular de *Staph. aureus*, interferência na síntese da parede celular de MRSA, e várias alterações em *Strep. mutans*, como separação parcial da parede celular e citoplasma, desintegração da parede celular, extravasamento de conteúdo citoplasmático e perda de material celular eletrodense. As substâncias 1 e 4 exibiram boa atividade antifúngica contra *Trichophyton rubrum*, com CIM de 62,5 e 7,8  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, e moderada a fraca atividade contra *C. albicans* (125 e 500  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente). A substância 1 exibiu o melhor resultado contra a linhagem de *P. falciparum* (CI<sub>50</sub> 14  $\mu\text{M}$ ). A substância 4 ainda exibiu baixo potencial contra as formas epimastigotas (CI<sub>50</sub> 92  $\mu\text{M}$ ) e tripomastigotas (CI<sub>50</sub> 64  $\mu\text{M}$ ) de *T. cruzi*. No teste de citotoxicidade das substâncias frente a células VERO, apenas a substância 4 provocou morte celular nas concentrações testadas, com CC<sub>50</sub> de 148  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento farmacológico da planta amazônica *A. panurensis*, e fornece possíveis modelos estruturais para o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos.

**Palavras-chave:** Bioautografia, Bactérias, Microscopia eletrônica, Estirilpironas, Ácido furanacético.

## ABSTRACT

Due to the spread of multiresistant strains and limitations of commercially available drugs for the treatment of infectious diseases, studies aimed at finding molecules that can serve for the development of new drugs are essential. Plants of the genus *Aniba* are related to the production of secondary metabolites of chemical classes known for their bioactivities. The aim of the present study was to perform a phytochemical study of bioactive ethanolic extracts of *A. panurensis*, *A. parviflora* and *A. ferrea*, for the isolation of bioactive compounds. Ethanolic extracts and phases of liquid-liquid partition were tested against 23 gram-negative bacteria, 9 gram-positive bacteria and the parasite *Plasmodium falciparum* (FRC3 strain). The isolated compounds were tested for their antibacterial, antifungal, anti-*Plasmodium*, antichagasic and anti-*Leishmania* activity. The ethanolic extracts and Hex and CHCl<sub>3</sub> phases of *A. panurensis* leaves and branches had good activity against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus simulans*, *Staph. aureus*, methicillin-resistant *Staph. aureus* (MRSA) and *Streptococcus mutans* ( $7.8 \leq \text{MIC} \leq 250 \mu\text{g} / \text{mL}$ ). The bioactive phases were submitted to bioautography assays and the CHCl<sub>3</sub> phase of *A. panurensis* branches was selected for the bioguided chemical fractionation by the same technique. Flash column chromatography was used for the isolation of compounds which were identified by spectrometric and spectroscopic methods as: 5,6 dehydrokawain (compound 1); 4-methoxy-11,12-methylenedioxy-6-trans-styryl-pyran-2-one (compound 2); 6.6 - (2,4-Bis (3,4-dimethoxyphenyl) cyclobutane-1,3-diyl) bis (4-methoxy-2H-pyran-2-one) (compound 3); and 2- Furanacetic acid, 4-dodecyltetrahydro-5-oxo-, (compound 4). Only compound 4 exhibited antibacterial activity, with MICs values of  $7.8 \mu\text{g} / \text{mL}$  for Staphylococcal strains,  $125 \mu\text{g} / \text{mL}$  for *B. subtilis* and  $31.25 \mu\text{g} / \text{mL}$  for *Strep. mutans*. Time-kill curve showed bactericidal behavior of compound 4 at 4-fold of their respective MIC against *Staph. aureus* and MRSA at 12 hours and 9 hours, respectively. Against *Strep. mutans*, compound 4 was bactericidal at its corresponding MIC within 6 hours. The antibacterial modes of action of substance 4 were taken by Scanning (SEM) and Transmission (TEM) Electron Microscopy, in which it was possible to observe the separation of the cytoplasm from the cell wall of *Staph. aureus*, interference with MRSA cell wall synthesis, and several changes in *Strep. mutans* cells, such as partial separation of cell wall and cytoplasm, cell wall disintegration, extravasation of cytoplasmic content and loss of electron dense cell material. Compounds 1 and 4 exhibited good antifungal activity against *Trichophyton rubrum*, with MICs values of 62.5 and  $7.8 \mu\text{g} / \text{mL}$ , respectively, and moderate and poor activity against *C. albicans* (125 and  $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively). Compound 1 exhibited the best result against *P. falciparum* strain ( $\text{IC}_{50}$   $14 \mu\text{M}$ ). Compound 4 further exhibited low potential against *T. cruzi* epimastigote ( $\text{IC}_{50}$   $92 \mu\text{M}$ ) and trypomastigote ( $\text{IC}_{50}$   $64 \mu\text{M}$ ). In cytotoxicity test against VERO cells, only compound 4 caused cell death at the concentrations tested, with  $\text{CC}_{50}$  value of  $148 \mu\text{g} / \text{mL}$ . These results contribute to the pharmacological knowledge of the Amazonian plant *A. panurensis* and provide possible structural models for the development of new antimicrobial drugs.

**Keywords:** Bioautography, Bacteria, Electron microscopy, Styrylpyrones, Furanacetic acid.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b>	Mecanismo de ação dos antibióticos .....	19
<b>Figura 02.</b>	Mecanismos de resistência bacterianos .....	22
<b>Figura 03.</b>	Mecanismo de ação dos principais antifúngicos utilizados .....	26
<b>Figura 04.</b>	Incidência de malária no mundo .....	27
<b>Figura 05.</b>	Ciclo de vida do parasita <i>Plasmodium falciparum</i> .....	29
<b>Figura 06.</b>	Ciclo de vida heteroxênico de <i>Leishmania</i> sp. ....	33
<b>Figura 07.</b>	Distribuição da Doença de Chagas no mundo .....	36
<b>Figura 08.</b>	Ciclo heteroxênico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	37
<b>Figura 09.</b>	Estruturas químicas dos fármacos utilizados no tratamento da Doença de Chagas .....	38
<b>Figura 10.</b>	<i>Aniba panurensis</i> na Reserva Florestal Adolpho Ducke. ....	44
<b>Figura 11.</b>	Estrutura química de neolignananas de <i>Aniba</i> spp. com atividades biológicas .....	45
<b>Figura 12.</b>	Estrutura química das riparinas I, II e III .....	47
<b>Figura 13.</b>	Estrutura química de anibina e anibamina .....	48
<b>Figura 14.</b>	Estrutura química dos alcaloides reticulina e isoboldina .....	48
<b>Figura 15.</b>	Estrutura química da estilipirona Dihidrogoniotalamina (DGT) .....	49
<b>Figura 16.</b>	Fluxo de procedimentos .....	52
<b>Figura 17.</b>	Metodologia da partição líquido-líquido utilizada para obtenção de frações .....	54
<b>Figura 18.</b>	Bioautografia da fase hexânica de folhas de <i>A. panurensis</i> eluída duas vezes em Hex:AcOEt (3:7) frente à MRSA. A= UV 365 nm; B= UV 254 nm; C= revelador vanilina sulfúrica; D= teste de bioautografia .....	77
<b>Figura 19.</b>	Bioautografia da fase CHCl <sub>3</sub> de folhas de <i>A. panurensis</i> eluída duas vezes em Hex:AcOEt (1:9) frente à MRSA. A= UV 365 nm; B= UV 254 nm; C= revelador vanilina sulfúrica; D= teste de bioautografia .....	77
<b>Figura 20.</b>	Bioautografia da fase CHCl <sub>3</sub> de folhas de <i>A. panurensis</i> eluída duas vezes em DCM:MeOH (9:1) frente à <i>Staph. simulans</i> A= UV 365 nm; B= UV 254 nm; C= revelador vanilina sulfúrica; D= teste de bioautografia .....	78

<b>Figura 21.</b>	Bioautografia da fase hexânica de galhos de <i>A. panurensis</i> eluída duas vezes em Hex:AcOEt (3:7) frente à MRSA. A= UV 365 nm; B= UV 254 nm; C= revelador vanilina sulfúrica; D= teste de bioautografia .....	79
<b>Figura 22.</b>	Bioautografia da fase CHCl <sub>3</sub> de galhos de <i>A. panurensis</i> eluída duas vezes em Hex:AcOEt (3:7) frente à MRSA. A= UV 365 nm; B= UV 254 nm; C= revelador vanilina sulfúrica; D= teste de bioautografia .....	79
<b>Figura 23.</b>	Bioautografia da fase CHCl <sub>3</sub> de galhos de <i>A. panurensis</i> eluída em CHCl <sub>3</sub> :MeOH (9,5:0,5) frente à MRSA. A= UV 365 nm; B= UV 254 nm; C= revelador vanilina sulfúrica; D= teste de bioautografia .....	79
<b>Figura 24.</b>	Figura 24: Placas de CCD das frações obtidas em cromatografia em coluna FLASH da fase CHCl <sub>3</sub> do extrato etanólico de galhos de <i>A. panurensis</i> eluídas em DCM:AcOEt (7:3). (A= UV 365 nm; B= UV 254 nm; C= Vanilina sulfúrica; D= Dragendorff) .....	81
<b>Figura 25.</b>	Fase em CHCl <sub>3</sub> de galhos <i>A. panurensis</i> eluída duas vezes em Hex:AcOEt (3:7). A= bioautografia da fração; B= placa revelada em vanilina sulfúrica. ....	82
<b>Figura 26.</b>	Bioautografia das frações F6 e F7 da coluna cromatográfica de fase em CHCl <sub>3</sub> de <i>A. panurensis</i> . Eluentes: DCM:AcOEt 7:3. A= 365 nm; B= 254 nm; C= Vanilina sulfúrica; D= Teste de bioautografia .....	82
<b>Figura 27.</b>	Espectro de massas em fonte APCI modo positivo, placa de CCD (DCM:AcOEt 9:1) e estrutura química da substância 1. Reveladores CCD: A) UV 365 nm; B) UV 254 nm; C) Vanilina sulfúrica .....	83
<b>Figura 28.</b>	Espectro de massas em fonte APCI modo positivo, placa de CCD (DCM:AcOEt 9,5:0,5) e estrutura química da substância 2. Reveladores CCD: A) UV 365 nm; B) UV 254 nm; C) Vanilina sulfúrica .....	84
<b>Figura 29.</b>	CCD das subfrações (F5.1 a F5.9) obtidas em cromatografia em coluna Flash da fração F5 da fase em CHCl <sub>3</sub> de galhos de <i>A. panurensis</i> . Eluentes: DCM:AcOEt 9:1 por duas vezes; Revelador: vanilina sulfúrica. ....	85
<b>Figura 30.</b>	Espectro de massas em fonte APCI modo positivo, placa de CCD (DCM:AcOEt 1:9) e estrutura química da substância 3. Reveladores CCD: A) UV 365 nm; B) UV 254 nm; C) Vanilina sulfúrica .....	86
<b>Figura 31.</b>	CCD em Hex:AcOEt (1:1) das subfrações obtidas em cromatografia em coluna Flash da fração F7 da fase em CHCl <sub>3</sub> de galhos de <i>A. panurensis</i> (C1F7), com C1F7.6 destacada em tracejado vermelho. A) 365nm; B) 254nm; C) Vanilina sulfúrica .....	87
<b>Figura 32.</b>	Bioautografia de C1F7.6 contra MRSA .....	88
<b>Figura 33.</b>	CCD em Hex:AcOEt (1:1) das subfrações obtidas em coluna cromatográfica Flash de C2F7, com C2F7.4 e C2F7.5 destacadas em tracejado vermelho. A) 365nm; B) 254nm; C) Vanilina sulfúrica .....	89
<b>Figura 34.</b>	CCD das subfrações C2F7.4 e C2F7.5 eluídas em DCM:AcOEt 9:1 por duas vezes. Revelador: Vanilina sulfúrica .....	89

<b>Figura 35.</b>	CCD em DCM:AcOEt (7:3) das subfrações obtidas em coluna cromatográfica Flash de C3F7. A) 365nm; B) 254nm; C) Vanilina sulfúrica .....	90
<b>Figura 36.</b>	Bioautografia de subfrações reunidas de C3F7. A: C3F7.5 + C3F7.6 + C3F7.7; B: C3F7.8+C3F7.9 .....	91
<b>Figura 37.</b>	CCD das subfrações reunidas C3F7.5+C3F7.6+C3F7.7 em Hex:AcOEt 3:7. A= CCD da amostra; B= CCD das regiões extraídas com CHCl <sub>3</sub> :MeOH 9:1 .....	91
<b>Figura 38.</b>	Espectro de massas <i>full scan</i> da substância 4 e placa de CCD eluída em Hex:AcOEt (3:7). A= 365nm; B= 254nm; C= Vanilina sulfúrica .....	93
<b>Figura 39.</b>	Estrutura química da substância 4 .....	93
<b>Figura 40.</b>	Correlação dos Rfs com bioatividade da fase em CHCl <sub>3</sub> com os Rfs das substâncias isoladas, ambos eluídos em Hex:AcOEt (3:7). A= Bioautografia da fração em CHCl <sub>3</sub> ; B= Fração em CHCl <sub>3</sub> em UV 365 nm; C= Fração em CHCl <sub>3</sub> em UV 254 nm; D= Fração em CHCl <sub>3</sub> em Vanilina sulfúrica; E= Substâncias 1, 2, 3 e 4 reveladas em vanilina sulfúrica .....	95
<b>Figura 41.</b>	Correlação dos Rfs com bioatividade da fase em CHCl <sub>3</sub> com os Rfs da substância 4, ambos eluídos em Hex:AcOEt (3:7) por duas vezes. A= Bioautografia da fase em CHCl <sub>3</sub> ; B= Fase em CHCl <sub>3</sub> em UV 254 nm; C= Fase em CHCl <sub>3</sub> em Vanilina sulfúrica; D = Substância 4 revelada em UV 254nm; E= Substância 4 revelada em vanilina sulfúrica .....	95
<b>Figura 42.</b>	Curva de tempo-morte da substância 4 frente às bactérias <i>Staph. aureus</i> (A), MRSA (B) e <i>Strep. mutans</i> (C). CIM : Concentração Inibitória Mínima. ....	97
<b>Figura 43.</b>	Micrografias de MEV (A,B,C,D) e MET (E,F,G,H) de <i>Staphylococcus aureus</i> tratadas com a substância 4 de <i>Aniba panurensis</i> . Controle (A,B ,E) e células tratadas com a substância 4 (C,D,F,G,H). Bar = 5 µm (B,D), 2 µm (C), 1 µm (A), 200 nm (E,F), 100 nm (G,H).....	99
<b>Figura 44.</b>	Micrografias de MEV (A,B,C,D) e MET (E,F,G,H) de MRSA tratadas com a substância 4 de <i>Aniba panurensis</i> . Controle (A,B,E) e células tratadas com a substância 4 (C,D,F,G,H). Bar = 5 µm (B), 2 µm (A,C,D), 100 nm (E,G,H), 50 nm (F).....	100
<b>Figura 45.</b>	Micrografias de MEV (A,B,C,D) e MET (E,F,G,H) de <i>Streptococcus mutans</i> tratadas com a substância 4 de <i>Aniba panurensis</i> . Controle (A,B,E) e células tratadas com a substância 4 (C,D,F,G,H). Bar = 5 µm (B), 1 µm (A,C,D), 200 nm (E,H), 100 nm (F), 50 nm (G).....	100

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Dados da coleta das espécies vegetais .....	53
-----------------	---	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Lista das cepas bacterianas Gram negativas .....	57
<b>Tabela 2</b>	Lista das cepas bacterianas Gram positivas .....	57
<b>Tabela 3</b>	Rendimento de extratos etanólicos de folhas e galhos de <i>A. panurensis</i> , <i>A. parviflora</i> e <i>A. ferrea</i> .....	70
<b>Tabela 4</b>	Rendimento de fases obtidas por partição líquido-líquido de folhas e galhos de <i>A. panurensis</i> , <i>A. parviflora</i> e <i>A. ferrea</i> .....	71
<b>Tabela 5</b>	Média dos halos de inibição $\pm$ desvio padrão de amostras de folhas e galhos de <i>A. panurensis</i> frente às bactérias <i>B. subtilis</i> , <i>Strep. mutans</i> , <i>Staph. simulans</i> , <i>Staph. aureus</i> e MRSA .....	72
<b>Tabela 6</b>	Concentração Inibitória Mínima das amostras de folhas e galhos de <i>A. panurensis</i> ( $\mu\text{g/mL}$ ) frente às bactérias <i>B. subtilis</i> , <i>Strep. mutans</i> , <i>Staph. simulans</i> , <i>Staph. aureus</i> e MRSA .....	73
<b>Tabela 7</b>	Valores de $\text{CI}_{50}$ de extratos e fases de <i>A. panurensis</i> , <i>A. parviflora</i> e <i>A. ferrea</i> .....	75
<b>Tabela 8</b>	Eluentes utilizados no fracionamento químico da fase $\text{CHCl}_3$ do extrato etanólico de galhos de <i>A. panurensis</i> .....	81
<b>Tabela 9</b>	Eluentes utilizados no fracionamento químico da fração F5 da fase em $\text{CHCl}_3$ do extrato etanólico de galhos de <i>A. panurensis</i> .....	85
<b>Tabela 10</b>	Eluentes utilizados no fracionamento químico da fração F7 da fase em $\text{CHCl}_3$ do extrato etanólico de galhos de <i>A. panurensis</i> - C1F7 .....	87
<b>Tabela 11</b>	Eluentes utilizados no fracionamento químico de C2F7 .....	88
<b>Tabela 12</b>	Eluentes utilizados no fracionamento químico de C3F7 .....	90
<b>Tabela 13</b>	Dados dos deslocamentos químicos experimentais da substância 4. ....	92
<b>Tabela 14</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da substância 4 ( $\mu\text{g/mL}$ ) frente às bactérias <i>B. subtilis</i> , <i>Staph. simulans</i> , <i>Staph. aureus</i> , MRSA e <i>Strep. mutans</i> .....	94
<b>Tabela 15</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) das substâncias dos galhos de <i>A. panurensis</i> .....	102
<b>Tabela 16</b>	Valores de $\text{CI}_{50}$ para as substâncias isoladas de galhos de <i>A. panurensis</i> testadas contra <i>P. falciparum</i> .....	103
<b>Tabela 17</b>	Valores de $\text{CC}_{50}$ das substâncias obtidas de galhos de <i>A. panurensis</i> frente à linhagem VERO .....	105

## LISTA DE SIGLAS

AcOEt - Acetato de Etila  
APCI - *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*  
BHI – *Brain Heart Infusion*  
CBM – Concentração Bactericida Mínima  
CC<sub>50</sub> – Concentração citotóxica em 50% das células  
CCD - Cromatografia em Camada Delgada  
CE<sub>50</sub> – Concentração Efetiva em 50% das células  
CFM – Concentração Fungicida Mínima  
CHCl<sub>3</sub> – Clorofórmio  
CI<sub>50</sub> - Concentração Inibitória em 50% das células  
CIM - Concentração Inibitória Mínima  
COSY - Homonuclear Correlation Spectroscopy  
DCM - Diclorometano  
DEPT - *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*  
DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's medium*  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
EtOH - Etanol  
HEX - Hexano  
HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*  
HMQC - *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*  
Hz - Hertz  
 $m/z$  - Razão massa e carga  
MeOH – Metanol  
MH – Müller Hinton  
MHA - Müller Hinton Agar  
MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina  
PBS - *Phosphate Buffered Saline*  
Rf - Fator de Retenção  
RMN <sup>1</sup>H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio  
RMN <sup>13</sup>C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono  
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*  
 $\delta$  - deslocamento químico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
<b>2.1 Infecções bacterianas: antibióticos e multirresistência</b> .....	18
<b>2.2 Infecções causadas por fungos e desafios no tratamento</b> .....	24
<b>2.3 Malária</b> .....	26
2.3.1. Ciclo de vida do parasita <i>Plasmodium</i> spp .....	28
2.3.2. Tratamento da malária e resistência de <i>Plasmodium</i> spp. ....	29
<b>2.4 Leishmaniose</b> .....	31
2.4.1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp .....	32
2.4.2. Limitações da quimioterapia da Leishmaniose .....	33
<b>2.5 Doença de Chagas</b> .....	35
2.5.1. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	36
2.5.2. Desafios no tratamento da Doença de Chagas .....	37
<b>2.6 Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos</b> .....	39
<b>2.7 A Família Lauraceae Juss.</b> .....	41
<b>2.8 O gênero <i>Aniba</i> Aubl</b> .....	43
2.8.1 Constituintes químicos isolados de <i>Aniba</i> e atividades biológicas ...	44
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	51
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	51
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	51
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	52
<b>4.1 Fluxo de Procedimentos</b> .....	52
<b>4.2 Material Botânico</b> .....	53
<b>4.3 Obtenção dos extratos etanólicos</b> .....	53
<b>4.4 Partição líquido-líquido</b> .....	54
<b>4.5 Fracionamento por métodos cromatográficos</b> .....	54
4.5.1 Cromatografia em Camada Delgada .....	54
4.5.2 Cromatografia em Coluna .....	55
<b>4.6 Identificação de constituintes químicos</b> .....	55
4.6.1 Métodos espectrométricos .....	55
4.6.2 Métodos espectroscópicos .....	56
<b>4.7 Ensaios Biológicos</b> .....	56
4.7.1 Teste antibacteriano por difusão em ágar .....	56
4.7.2 Teste de atividade antibacteriana por microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) .....	58
4.7.3 Teste antibacteriano por Bioautografia .....	59
4.7.4 Teste antibacteriano por curva tempo-morte ( <i>time-kill</i> ) .....	60
4.7.5 Análise de alterações celulares por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	61
4.7.6 Análise de alterações celulares por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	61
4.7.7 Teste antifúngico .....	62
4.7.8 Teste de antagonismo contra <i>Plasmodium falciparum</i> .....	63
4.7.9 Teste anti- <i>Trypanosoma</i> .....	65
4.7.10 Teste anti- <i>Leishmania</i> .....	67
4.7.11 Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> frente à linhagem celular VERO...	68
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	70

<b>5.1 Rendimento dos extratos etanólicos e fases obtidas por partição líquido-líquido</b> .....	70
<b>5.2 Testes biológicos com extratos e fases obtidas por partição líquido-líquido</b> .....	71
5.2.1 Teste antibacteriano dos extratos e fases de partição por difusão em ágar e microdiluição em caldo .....	71
5.2.2 Teste antiplasmódico de extratos e fases de partição .....	75
<b>5.3. Bioautografia das fases Hex e CHCl<sub>3</sub> de folhas e galhos de <i>A. panurensis</i></b> .....	76
<b>5.4 Isolamento e identificação dos constituintes</b> .....	80
5.4.1 Fracionamento químico da fração CHCl <sub>3</sub> de galhos de <i>A. panurensis</i> .....	80
5.4.2 Purificação e isolamento de substâncias .....	83
5.4.2.1 Substância 1 .....	83
5.4.2.2 Substância 2 .....	83
5.4.2.3 Substância 3 .....	84
5.4.2.4 Substância 4 .....	86
<b>5.5 Testes Biológicos das substâncias isoladas</b> .....	93
5.5.1 Atividade antibacteriana .....	94
5.5.1.1 Determinação da CIM e CBM .....	94
5.5.1.2 Curva de tempo-morte .....	96
5.5.1.3 Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Transmissão (MET) .....	98
5.5.2 Atividade antifúngica .....	101
5.5.3 Atividade antiparasitária contra <i>P. falciparum</i> , <i>T. cruzi</i> e <i>L. amazonensis</i> .....	103
5.5.4 Teste de citotoxicidade frente à linhagem celular VERO .....	104
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	106
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	108
<b>ANEXOS</b> .....	134

# 1 INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas são doenças causadas por micro-organismos como bactérias, vírus, fungos e parasitas, os quais invadem o organismo do hospedeiro e se multiplicam, e têm causado milhões de mortes no mundo, especialmente nos países em desenvolvimento (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; FURUSE, 2019). Muitos destes países continuam a confrontar problemas de saúde tais como a diarreia, a pneumonia e a malária, que tem maior probabilidade de matar crianças com menos de cinco anos de idade (WHO, 2015).

Um grande desafio em controlar doenças infecciosas é o aumento da incidência de resistência a drogas dos micro-organismos. O desenvolvimento de fármacos eficientes no combate destas enfermidades revolucionou o tratamento médico nas últimas décadas, ocasionando a redução drástica da mortalidade. Porém, o uso disseminado e inadequado de antimicrobianos fez com que alguns patógenos, principalmente bactérias, também desenvolvessem defesas relativas aos quimioterápicos, com o conseqüente aparecimento de resistência (ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018; WHO, 2014).

A resistência aos antimicrobianos é uma das maiores ameaças globais à saúde pública, pois infecções comuns que eram até então tratáveis estão levando ao óbito (WHO, 2014). Infecções causadas por micro-organismos multirresistentes são de difícil tratamento devido à limitação das opções de antimicrobianos disponíveis, e resultam em maiores períodos de internação hospitalar, aumento das taxas de mortalidade e elevação dos custos de assistência à saúde (LAMMIE; HUGHES, 2016; WHO, 2014). Além de acometer bactérias e fungos, o fenômeno de resistência também tem se espalhado entre as doenças parasitárias, as quais causam milhões de mortes, especialmente na África, América Latina e Ásia. Este problema se torna ainda mais preocupante pelo fato de que entre as dez principais doenças tropicais negligenciadas globalmente importantes, sete são parasitárias, incluindo tripanossomíases, leishmanioses e malária, sendo esta última, a doença parasitária que mais mata no mundo (HOTEZ et al., 2014). Somado a isso, algumas dessas enfermidades ainda não possuem agentes terapêuticos eficazes (ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018) com limitações como, dificuldade de administração e toxicidade (ANTOSZCZAK; STEVERDING; HUCZYŃSKI, 2019).

Nesse contexto, há a necessidade urgente de novas fontes alternativas de substâncias antimicrobianas para o combate destas doenças. A natureza, com suas numerosas plantas, micro-organismos e organismos, contém uma quantidade

surpreendente de moléculas com grande variedade de estruturas químicas e propriedades farmacológicas. E desta forma, os produtos naturais, pelo seu histórico na medicina tradicional e indústria farmacêutica, continuam a ser a maior fonte de esperança para a descoberta de moléculas para o desenvolvimento de novas drogas (BUTLER, 2004; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

O interesse no potencial farmacológico da família botânica Lauraceae é devido ao uso de suas espécies na medicina tradicional (MARQUES, 2001), além do que, diversos trabalhos já demonstraram que a mesma produz diferentes metabólitos secundários com importantes atividades farmacológicas, tais como, efeitos citotóxicos, fungicidas, antibacterianos e antiparasitários. Devido ao potencial biotecnológico apresentado por esta família, ela se torna um ótimo objeto para a pesquisa de substâncias com finalidade farmacêutica, inclusive como fonte de antimicrobianos.

*Aniba* é um gênero dessa família que, apesar de relativamente pouco estudado com relação às suas atividades antimicrobianas, já demonstrou ser produtor de moléculas com propriedades antibacterianas e antiparasitárias (CATÃO et al., 2005; CATÃO et al., 2010; CUSTÓDIO, 2013; SOUZA, 2014; BASTOS, 2015; FERNANDES, 2017), entre outras atividades biológicas.

Bastos (2015) realizou um estudo com extratos de vinte e cinco espécies de plantas amazônicas, a fim de investigar suas propriedades antimicrobianas. De extratos e frações de *A. panurensis*, *A. parviflora* e *A. ferrea* foram obtidos os melhores resultados frente a bactérias patogênicas, apresentando as menores concentrações inibitórias mínimas, e, conseqüentemente, se tornaram as mais promissoras para a continuidade dos estudos.

Pelo exposto, esse estudo teve como proposta realizar um estudo fitoquímico de extratos bioativos de *A. panurensis*, *A. parviflora* e *A. ferrea*, avaliando a ação antimicrobiana de substâncias isoladas, com o isolamento das substâncias sendo direcionado por ensaios de bioautografia. Além de bactérias, a bioatividade destas substâncias também foi avaliada contra fungos dermatófitos e a levedura *Candida albicans*, e frente aos protozoários *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*. Desta forma, o trabalho contribui para o conhecimento farmacológico de uma planta amazônica, identificando nessa biodiversidade, moléculas que possam ser utilizadas no desenvolvimento de novos fármacos.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Infecções bacterianas: antibióticos e multirresistência**

Doenças infecciosas têm sido uma das principais causas de mortalidade ao longo da história. Dentre as doenças infecciosas, as infecções bacterianas são responsáveis por diversas enfermidades disseminadas e combatidas no mundo inteiro, como diarreia, tuberculose, sífilis, meningite bacteriana, infecções do trato urinário, pneumonia, lepra, gonorreia, entre outros (TORTORA, 2017). Com a introdução dos antibióticos, no século 20, este problema tendeu a desaparecer, porém o surgimento de cepas multirresistentes com o passar dos anos contrariou os avanços alcançados (FAZLUL et al., 2019).

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de micro-organismos por interações específicas com alvos bacterianos (DAVIES; DAVIES, 2010). Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte das bactérias, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento e reprodução microbiana (TAVARES, 2014).

Os antibióticos mais relevantes utilizados atualmente tem mecanismos de ação particulares que afetam basicamente cinco processos metabólicos importantes da bactéria: a síntese da parede celular, a replicação do DNA e transcrição para RNA, a síntese de ácido fólico, a síntese de proteínas, e o rompimento da membrana citoplasmática (WALSH; TIMOTHY, 2013). Estes podem ser observados na Figura 01.

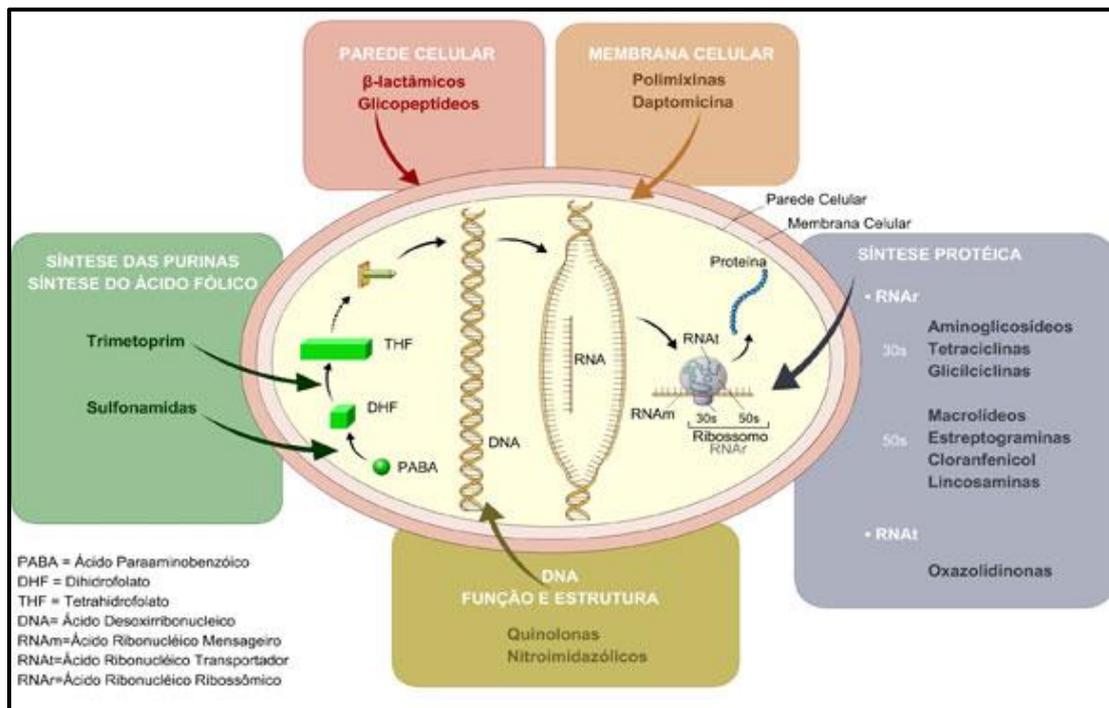


Figura 01: Mecanismo de ação dos antibióticos.  
 Fonte: <http://www.anvisa.gov.br>

Antibióticos que atuam na inibição da síntese da parede celular basicamente interferem na síntese do peptidoglicano. Os  $\beta$ -lactâmicos inibem proteínas necessárias para a formação do peptidoglicano, as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs, do inglês *Penicillin-Binding Proteins*) (ANDRADE; DARINI, 2017). Um exemplo é a ação dessa classe sobre a enzima transpeptidase, que realiza as ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas que formam o peptidoglicano da parede celular (DUARTE et al., 2019). Já glicopeptídeos, podem interferir em reações necessárias para a síntese da parede celular, como a vancomicina, que se liga à porção terminal D-Ala-D-Ala de um pentapeptídeo encontrado em precursores do peptidoglicano, evitando o processo de transpeptidação (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

Antibióticos também podem atuar na inibição da síntese de ácidos nucleicos, como os nitroimidazólicos, que através do seu grupo nitro induzem processos metabólicos que resultam na inativação do DNA (ANVISA, 2007), e como as quinolonas, que inibem as enzimas girase e topoisomerase IV, que atuam no processo de replicação do DNA (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017). No tratamento da tuberculose, a rifampicina inibe a enzima RNA polimerase da micobactéria, impedindo a síntese do RNA mensageiro e proteínas (LAVANIA et al., 2018). Há também os antibióticos que interferem na síntese de DNA e RNA atuando no metabolismo celular, como é o caso das

sulfonamidas e trimetoprim, que inibem, em diferentes etapas, a síntese do ácido fólico, que é cofator necessário para a síntese desses ácidos nucleicos (DIAS et al., 2018).

Antibióticos também podem afetar diretamente a síntese de proteínas, como as tetraciclina, aminoglicosídeos e macrolídeos, atuando nos ribossomos bacterianos, organelas responsáveis pela síntese protéica. As drogas ligam-se às subunidades formadoras do ribossomo, 30s e 50s, de forma a impedir a síntese dessas macromoléculas necessárias para o metabolismo celular (DUARTE et al., 2019).

Dentre os antibióticos que agem na membrana celular, temos as polimixinas, que atuam sequestrando o cálcio e o magnésio presentes na membrana externa de bactérias gram negativas, os quais são necessários para sua estabilidade. Isso provoca a desorganização da membrana celular, altera sua permeabilidade e provoca vazamento de conteúdo intracelular (TREVIZOL; MARTINS; QUEIROZ-FERNENDES, 2018). Porém, os efeitos adversos das polimixinas podem ser graves e incluem neurotoxicidade e nefrotoxicidade, o que torna o seu uso clínico limitado (DUARTE et al., 2019). A Daptomicina, que é um lipopeptídeo cíclico, atua sobre membranas de bactérias Gram positivas. Ela se insere nas membranas das bactérias, levando à rápida despolarização da membrana, provocando extravasamento do conteúdo citoplasmático e morte da célula bacteriana (SEYDLOVÁ et al., 2019).

Nas últimas décadas, a disseminação da resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis tornou-se questão de saúde pública, pois limita as opções terapêuticas existentes e se constitui ameaça crescente no tratamento de micro-organismos multirresistentes. Isso se deve principalmente ao uso indiscriminado de antibióticos, o que causa uma pressão seletiva (BUITRAGO et al., 2014). O primeiro caso de resistência bacteriana relatado ocorreu ainda na década de 40, com os primeiros registros de *Staphylococcus aureus* resistente à penicilina em ambiente hospitalar. Na década de 1960 surgiu o primeiro caso de resistência às penicilinas  $\beta$ -lactâmicas, como a meticilina, reconhecendo-se no final da década de 1970 a ocorrência mundial das cepas de *Staph. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Em 2002, foi descrito nos Estados Unidos o primeiro caso de *Staph. aureus* resistente à vancomicina (MIMICA, 2012).

A resistência prolifera-se rapidamente através de transferência genética, atingindo algumas das principais bactérias gram positivas, como enterococos, estafilococos e estreptococos (ACOSTA; VARGAS, 2018; SILVA; AQUINO, 2018). Além destas, muitas outras bactérias desenvolveram resistência aos antibióticos como diversas

bactérias gram negativas, *Mycobacterium tuberculosis* e *Neisseria gonorrhoeae* (SILVA; AQUINO, 2018).

Segundo Madigan et al. (2016), a resistência às drogas antimicrobianas é definida como a capacidade adquirida por um organismo de resistir a um agente quimioterápico ao qual este é normalmente sensível. Especialistas definiram que micro-organismos multirresistentes são definidos como aqueles resistentes a pelo menos um agente antimicrobiano de três classes distintas, e já cepas pan resistentes são aquelas não susceptíveis a todos os antimicrobianos em todas as classes (MAGIORAKOS et al., 2012).

A resistência de dado micro-organismo à determinada droga pode ser classificada inicialmente como intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é aquela que faz parte das características naturais, fenotípicas do micro-organismo, transmitida apenas verticalmente à prole, faz parte da herança genética. Já a resistência adquirida ocorre em microrganismos que desenvolveram mutações após a exposição ao fármaco e posteriormente houve a seleção, sobrevivência e proliferação daqueles mutantes resistentes (VIEIRA; SANTOS, 2017). Este tipo de resistência é o mais importante devido à crescente participação de micro-organismos com resistência adquirida na gênese de quadros clínicos infecciosos. A resistência adquirida tem origem genética e decorre de modificações na estrutura ou no funcionamento da célula bacteriana que bloqueiam a ação dos antimicrobianos. A composição genética do micro-organismo é alterada através de mutações no DNA cromossômico ou por aquisição de um DNA exógeno, podendo acarretar características vantajosas para a bactéria (MUNITA; ARIAS, 2016). A transferência de genes nesta forma de resistência pode ocorrer por conjugação, transdução ou transformação (SILVA; KNOBL; MORENO, 2013).

A capacidade do micro-organismo sobreviver à exposição de um antibiótico é devida a diversos mecanismos, sendo quatro os principais mecanismos de resistência bacteriana: bombas de efluxo (aumento na eliminação do antibacteriano), diminuição da permeabilidade da membrana, modificação no alvo de ação do antibiótico e a degradação do mesmo (produção de enzimas inativadoras) (BARIE, 2012), como ilustrado na Figura 02.

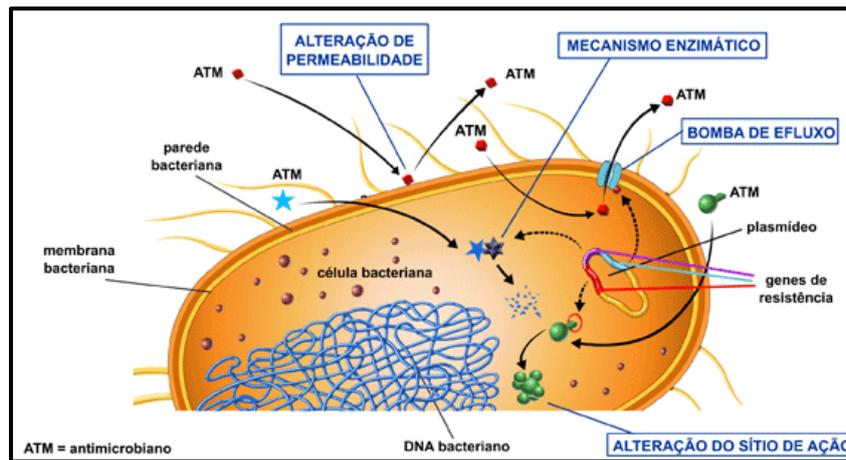


Figura 02: Mecanismos de resistência bacterianos.  
 Fonte: <http://www.anvisa.gov.br/>

O efluxo de antibióticos por bactérias gram negativas e gram positivas tem um papel importante entre os mecanismos de resistência. É amplamente reconhecido que a expressão de bombas de efluxo codificadas por genes em bactérias é, em grande parte, a principal responsável pelo fenômeno de resistência intrínseca aos antibióticos, também podendo contribuir para a resistência adquirida (WU et al., 2011). Este mecanismo de resistência se expressa, principalmente, pela produção de complexos de proteínas que atravessam toda a parede celular bacteriana, incluindo a membrana citoplasmática (GOH et al., 2002), e que, ativamente, promovem o efluxo dos antimicrobianos do interior da célula, prevenindo acumulação intracelular necessária para letalidade (MUNITA; ARIAS, 2016).

A modificação na permeabilidade das membranas bacterianas também é outra forma de resistência e o exemplo mais conhecido é a perda de porinas pelas bactérias. As porinas são canais de proteínas hidrofílicas embutidas na membrana externa apenas de bactérias gram negativas, permitindo a entrada de muitos antimicrobianos de mesma natureza (MUNITA; ARIAS, 2016). Assim, quando estas porinas perdem suas funções ou ocorrem mutações nos genes codificadores de porinas que resultam na perda destas, ocorre uma diminuição na permeabilidade da membrana, resultando em resistência, pois evita a entrada de muitos antibióticos (BELLO; DINGLE, 2018).

A modificação do sítio de ação do antimicrobiano parece ser o mais específico dos mecanismos de resistência. Ocorre a aquisição de genes que codificam novos produtos, e pode ocorrer por algumas maneiras como por mutações pontuais nos genes que codificam o alvo, alterações enzimáticas do local de ligação, substituição ou desvio do alvo e o desenvolvimento de uma via metabólica alternativa (MUNITA; ARIAS, 2016;

ZHANG; ZHANG; FANG, 2009). Um exemplo são as mutações que ocorrem em genes que codificam para PBPs em bactérias do gênero *Staphylococcus*. Estas proteínas estão envolvidas na síntese da parede celular bacteriana. Na presença de penicilina, ocorre a interferência na síntese do peptidoglicano, levando a um grande afluxo de água do meio intracelular para o meio externo, lisando a célula bacteriana. Algumas mutações em genes fazem com que ocorra a produção de uma proteína ligadora de penicilina adicional (PBP2a ou PBP2'), uma proteína ligante de penicilina com baixa afinidade a  $\beta$ -lactâmicos, e que atua como transpeptidase, retomando as funções da síntese de parede celular quando as outras PBPs estão inibidas, garantindo a integridade da célula bacteriana na presença de agentes beta-lactâmicos (MUNITA; ARIAS, 2016). A modificação das proteínas ligadoras de penicilina também é o principal modo de resistência à penicilina em outras bactérias, como as do gênero *Streptococcus* (TONG; ROSMARIN; SEFTON, 2019).

Um dos principais mecanismos de resistência antimicrobiana está relacionado à degradação dos compostos por atividade enzimática, sendo descrito como o principal problema global em unidades de saúde e nas comunidades. Essas enzimas podem modificar ou destruir as estruturas químicas dos antimicrobianos (SILVA; KNOBL; MORENO, 2013). A classe mais importante dessas enzimas é representada pelas  $\beta$ -lactamases que são enzimas específicas responsáveis pela inativação hidrolítica do anel  $\beta$ -lactâmico dos antibióticos penicilínicos e cefalosporínicos (ANDRADE; DARINI, 2017). Estas conferem resistência às penicilinas, cefens, monobactâmicos, cefalosporinas e carbapenêmicos, considerados os principais antimicrobianos no tratamento de infecções por bactérias gram negativas (BUSH, 2013). A enzima é secretada pelas cepas resistentes no periplasma e destroem os antibióticos antes de se ligarem às proteínas de ligação à penicilina (PBPs). A produção de beta-lactamases pode, também, ser responsável pela resistência de bactérias gram positivas a drogas como penicilina e ampicilina (SANTOS; DAMASCENO; SOUTO, 2019).

É importante salientar o aumento da incidência de casos de resistência antimicrobiana em Gram positivos, tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade. Apesar de as bactérias Gram-negativas terem dominado a atenção nos últimos anos, por causa de suas características complexas de resistência aos antimicrobianos, novos padrões de resistência em Gram-positivos têm ocorrido, principalmente em amostras clínicas provenientes da comunidade, onde tem sido possível identificar resistência, inclusive à vancomicina e à oxacilina (SANTOS; DAMASCENO; SOUTO, 2019). É de extrema relevância a descoberta de novos agentes antimicrobianos que possam fornecer

mecanismos de ação alternativos, sendo a melhor forma para o combate de infecções por bactérias multirresistentes.

## 2.2 Infecções causadas por fungos e desafios no tratamento

As infecções fúngicas possuem elevada prevalência mundial, especialmente em países tropicais e são particularmente graves em pacientes imunocomprometidos (DE RYCKER et al., 2018). Dentre os diversos tipos de infecções fúngicas existentes, neste trabalho serão abordadas as dermatofitoses e candidíase.

As micoses são infecções fúngicas bastante disseminadas no mundo, sendo principalmente causadas por fungos filamentosos queratinofílicos, denominados de dermatófitos, que utilizam a queratina como nutriente durante a infecção de pele, cabelos e unhas e são representados pelos gêneros *Tricophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum* (YOUNGCHIM et al., 2011). Além disso, as espécies de dermatófitos são divididas em zoofílicas, geofílicas e antropofílicas, dependendo de seu habitat primário (animais, solo ou humanos, respectivamente) (PERES et al., 2010).

As micoses (tineas) cutâneas estão entre as infecções mais comuns em humanos e se tornaram um importante problema de saúde pública, principalmente por causarem infecções invasivas em pacientes imunodeprimidos (FARHOUR et al., 2018). *T. rubrum* é o fungo mais frequente em casos clínicos de *tinea pedis* (pés), *tinea unguium* (unhas), *tinea corporis* (corpo) e *tinea cruris* (virilhas) (PERES et al., 2010). As onicomicoses, que acometem as unhas, atingem cerca de 10% da população mundial (AISHWARYA; GOEL; NIJHHAWAN, 2020) e podem afetar a qualidade de vida das pessoas podendo ocasionar até a perda da capacidade funcional do membro afetado, além das questões estéticas (EMAM; EL-SALAM, 2016). Seus principais agentes etiológicos são fungos filamentosos dermatófitos e leveduras, entre os quais podemos citar fungos do gênero *Tricophyton* e *Candida*, sendo *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* as espécies mais frequentemente relacionadas aos casos e *C. albicans* o principal patógeno responsável pela onicomicose por *Candida* (EMAM; EL-SALAM, 2016; OTA, 2017). A anatomia das unhas e a elevada espessura do tecido ungueal são consideradas um grande desafio para o tratamento, uma vez que dificulta a permeação das drogas antifúngicas de uso tópico causando reduzida efetividade, e somado ao uso inadequado pode resultar em

recidivas e no desenvolvimento de resistência fúngica (IORIZZO, 2015; ALIPOUR; MOZAFARI, 2015).

O tratamento das dermatofitoses geralmente envolve o uso de drogas pertencentes às classes das alilaminas e dos azóis, principalmente itraconazol e terbinafina (MARTINEZ-ROSSI et al., 2018). O tratamento prolongado, a toxicidade e efeitos colaterais causados por esses fármacos também são outros desafios nestas infecções (EMAM; EL-SALAM, 2016; BIESBROECK; FLECKMAN, 2015).

Além de estar relacionada às onicomicoses, *C. albicans* é o principal patógeno responsável pelas candidíases (candidoses), infecções que acometem principalmente imunocomprometidos, pacientes com câncer, pacientes que fazem uso excessivo de antibióticos ou terapias imunossupressoras como no caso de transplantes (HANI et al., 2015). O fungo *C. albicans* é uma levedura comensal, presente na cavidade bucal, no trato gastrointestinal, trato respiratório e na vagina da maioria dos indivíduos considerados saudáveis. A candidose é a infecção causada pelo crescimento excessivo desses microorganismos, frequentemente relacionada ao comprometimento do sistema imunológico do hospedeiro. Pode causar dois tipos principais de infecções em humanos: infecções superficiais, como candidíase oral e vaginal, e infecções sistêmicas, que podem levar à morte (MAYER; WILSON; HUBE, 2013). É um fungo pleomórfico, que pode assumir a forma leveduriforme ou filamentosa. As duas formas participam do processo infeccioso, onde a forma em levedura tem capacidade de disseminação enquanto a forma filamentosa, com a formação de hifas, tem a capacidade de invadir tecidos escapando das células fagocitárias do hospedeiro, sendo um importante fator de virulência. (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014). Nas últimas décadas, o aumento da incidência de resistência aos antifúngicos por *C. albicans* tem despertado a atenção dos profissionais de saúde e conseqüentemente impulsionado pesquisas na busca de novos fármacos (OLIVEIRA et al., 2016). É um dos principais patógenos fúngicos dos seres humanos, afetando milhões de pessoas e levando a óbito centenas de milhares em todo o mundo. Os azóis (fluconazol, cetoconazol e itraconazol) e polienos (nistatina e anfotericina B) são os principais antifúngicos utilizados para candidíases, e seu uso excessivo pode favorecer o aparecimento de resistência (GAO et al., 2018).

Os antifúngicos de uso comum apresentam um número limitado de alvos celulares, como o ergosterol, a síntese de ácidos nucleicos e da parede celular e a formação de microtúbulos (KAVITHA et al., 2018), como pode ser observado na Figura 03.

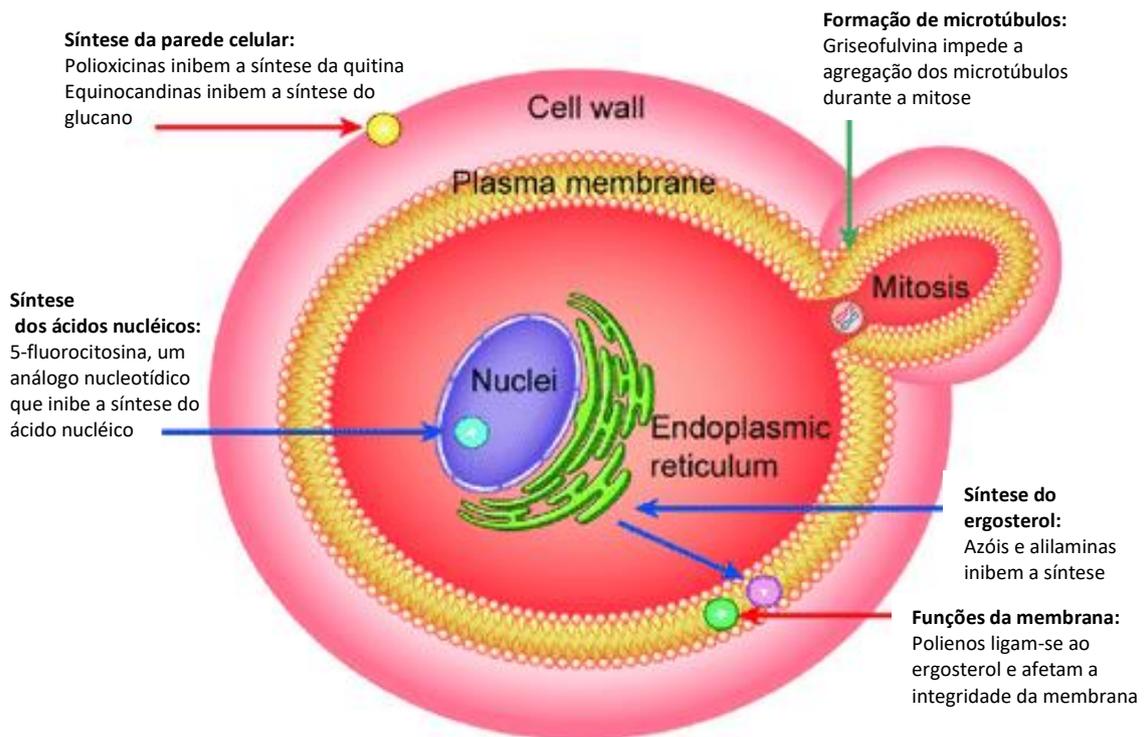


Figura 03: Mecanismo de ação dos principais antifúngicos utilizados.  
Fonte: Adaptado de Oliveira Santos et al. (2018).

Diversos mecanismos de resistência aos antifúngicos já foram identificados em dermatófitos e *Candida* spp. Dentre estes, os principais são modificação ou degradação do fármaco, alterações na interação com o sítio-alvo, aumento do efluxo celular e formação de biofilme. Linhagens de espécies fúngicas resistentes estão emergindo e se espalhando globalmente, ameaçando tornar os antifúngicos existentes obsoletos (GAO et al., 2018). A resistência antifúngica dificulta o tratamento, o que justifica a procura de novas moléculas com potencial antifúngico.

## 2.3 Malária

A malária é uma das infecções parasitárias mais importantes do mundo, transmitidas, principalmente, por mosquitos fêmeas infectadas do gênero *Anopheles* com o agente etiológico. É causada por protozoários do gênero *Plasmodium* (classe *Sporozoa*, família *Plasmodiidae*), sendo cinco espécies associadas à malária humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*, sendo *P. falciparum* a espécie responsável pela forma mais grave da doença (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008;

GOMES et al., 2011). A doença também pode ser adquirida através de transfusão sanguínea, compartilhamento de seringas, acidente de trabalho ou de forma congênita (NEVES, 2012).

Os sintomas da doença são calafrios seguidos de febre alta que duram de 3 a 4 horas, acompanhados de mal-estar, náuseas, cefaléias e dores articulares. Depois de um ou dois dias o quadro volta a se repetir por semanas até que o paciente, não tratado, cure espontaneamente ou chegue a óbito devido a complicações renais, pulmonares e coma cerebral. É a causa mais comum de morte prevenível entre as doenças infecciosas em viajantes, assim como a causa mais frequente de febre pós viagem, devido ao fato de turistas virem de regiões livre de malária e, por conta disso, apresentarem pouca ou nenhuma imunidade (BAIRD; NELWAN; TAYLOR, 2019).

A ocorrência de malária no mundo pode ser observada na Figura 04. A maior incidência da doença ocorre no continente africano, especialmente ao sul do deserto do Saara. No Brasil, incide predominantemente na Amazônia Legal, que engloba os Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, ocorrendo casos raros em outras regiões do país (CARLOS et al., 2019; CDC, 2017). Apenas *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* estão relacionados à malária em humanos no país (CARLOS et al., 2019).

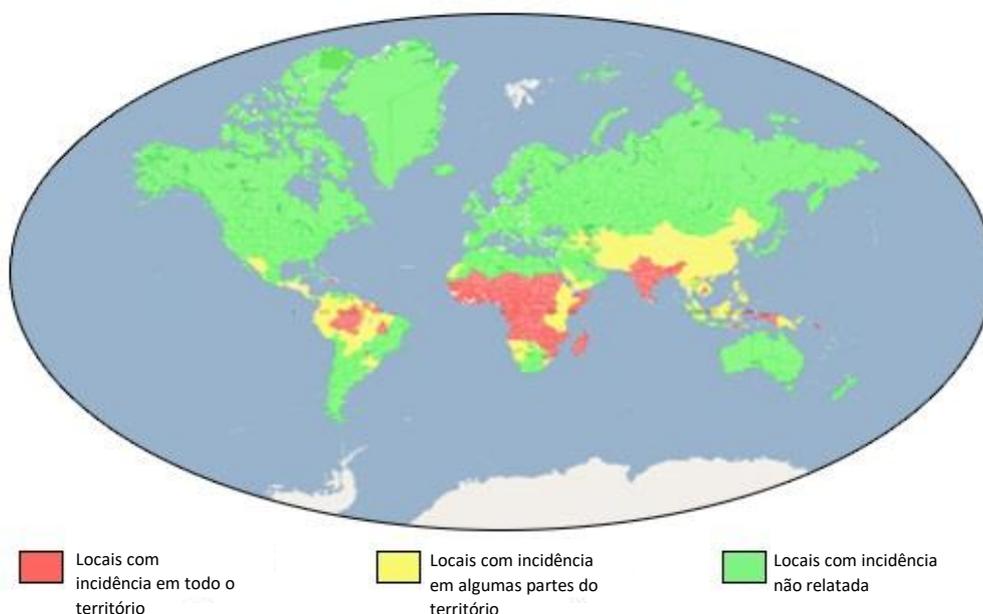


Figura 04: Incidência de malária no mundo.  
Fonte: <https://www.cdc.gov>

Cerca da metade da população corre o risco de ser infectada com malária, sendo que 212 milhões de casos de malária foram notificados com 429 mil mortes no ano de

2016 (WHO, 2017). É uma das cinco maiores causas de morbidade no mundo. Os grupos considerados de alto risco para a malária são crianças, mulheres grávidas e imunocomprometidos. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde de 2012, em áreas endêmicas uma criança morria a cada minuto por causa da doença (WHO, 2012).

### **2.3.1 Ciclo de vida do parasita *Plasmodium* spp.**

O ciclo de vida do parasita da malária envolve dois hospedeiros: o homem e mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* (Figura 05).

Durante uma hematofagia, um mosquito *Anopheles* feminino infectado inocula esporozoítos no hospedeiro humano, permanecendo ali por cerca de 15 minutos antes de alcançarem a corrente sanguínea. Estes infectam as células do fígado, cerca de 30 minutos após a infecção, e amadurecem em esquizontes, que rompem e liberam os merozoítos. Em *P. vivax* e *P. ovale*, um estágio adormecido dos parasitas, os hipnozoítos, pode persistir no fígado e causar recaídas ao invadir a corrente sanguínea semanas ou até mesmo anos depois. Merozoítos infectam glóbulos vermelhos e lá realizam esquizogonia e evoluem para trofozoítos. O núcleo do trofozoíto começa a se dividir várias vezes, de forma assexuada, o que resulta em uma forma multinucleada, o esquizonte. O esquizonte rompe-se, liberando merozoítos que vão invadir outras hemácias, e podem repetir o processo assexuado (esquizogonia eritrocítica), ou iniciar o ciclo sexuado. A repetição do ciclo assexuado nas hemácias é denominado ciclo eritrocítico e se repete sucessivas vezes, a cada 48h, nas infecções pelo *P. falciparum*, *P. vivax*, e *P. ovale*, e a cada 72h, nas infecções pelo *P. malariae*. Os parasitas do estágio sanguíneo são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença (NEVES, 2012; CDC, 2017).

No ciclo eritrocítico, alguns parasitas se diferenciam em estágios sexuais (gametócitos). Os gametócitos, machos (microgametócitos) e fêmeas (macrogametócitos), são ingeridos por um mosquito anofelino durante a hematofagia. A multiplicação dos parasitas no mosquito é conhecida como o ciclo esporogônico. No intestino médio do mosquito, os microgametas penetram os macrogametas gerando zigotos. Os zigotos, por sua vez, tornam-se móveis e alongados, os oocinetos, os quais atravessam a parede do estômago e se alojam na membrana basal diferenciando-se em oocistos. Os oocistos crescem, se rompem e liberam esporozoítos, que se dirigem para as glândulas salivares do mosquito. A inoculação dos esporozoítos em um novo hospedeiro



(LLANOS-CUENTAS et al., 2019; SUSAM, 2019). E, por último, os profiláticos causais (cloroquina, mefloquina, proguanil, pirimetamina e doxiciclina) que evitam a invasão dos eritrócitos ao atuarem nos parasitas quando estes emergem do fígado após o estágio pré-eritrocitário (TRACY; WEBSTER, 2005; CAPOTE, 2017).

O quinino, principal alcaloide da chinchona, foi o primeiro fármaco utilizado no tratamento da malária. A cloroquina foi um fármaco desenvolvido durante a segunda guerra mundial e era utilizada para todos os tipos de plasmódios, até o surgimento da resistência de cepas de *P. falciparum* a esta droga. Por conta disso, um derivado do quinino, a mefloquina, foi desenvolvida para tratar estas cepas resistentes à cloroquina (PEDRO, 2011). No entanto, a mefloquina possui meia vida prolongada, e propiciou rápida seleção de parasitos resistentes. Atualmente é recomendada somente em combinação com outros compostos, sobretudo com derivados de artemisinina (WHO, 2013).

A artemisinina foi isolada de *Artemisia annua* L. na década de 70, e seus derivados assumiram grande importância no tratamento da malária, utilizando terapias combinadas que evitam resistência. Estas terapias combinadas com artemisinina (ACT) reduziram a prevalência e a mortalidade da doença (WHO, 2012), no entanto, cepas de *P. falciparum* resistentes aos agentes têm se disseminado pelo mundo, desde seu surgimento no sudeste de Ásia e na América do Sul (SU et al., 2019). Além disso, os medicamentos necessários não são acessíveis para muitos que precisam deles e a dosagem é complexa, de modo que as monoterapias ainda são amplamente utilizadas e isso também promove resistência genética (DONDORP et al., 2010; WHO, 2016), havendo então a necessidade de novas alternativas terapêuticas.

Geralmente, os mecanismos que conferem resistência ao parasita são através de mutações que modificam os alvos onde atuam as drogas ou os transportadores envolvidos na distribuição da droga no parasito dentro do eritrócito (ROSS; FIDOCK, 2019). A interação dos padrões de uso dos medicamentos, características intrínsecas do fármaco, fatores relacionados ao hospedeiro e fatores ambientais do inseto vetor também podem contribuir para a expansão da resistência (WONGSRICHANALAI et al., 2002).

Além de pesquisas que envolvam investigação de produtos naturais com atividade antimalárica, outros fatores podem contribuir para o desenvolvimento de novas drogas contra a doença, como: a elucidação do genoma de espécies de *Plasmodium*, a análise da interação parasita-hospedeiro, identificação de alvos para vacina, análises de

transcriptoma, metabolômica e proteômica e novas compreensões dos estágios do desenvolvimento do parasita (NGO; OKOGUN; FOLK, 2013).

## 2.4 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, família *Trypanosomatidae*, e transmitida através da picada de insetos dípteros fêmeas infectadas dos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (HAILU et al., 2016). Cerca de 20 espécies do gênero *Leishmania* podem ser transmitidas por 30 espécies de flebotomíneos (WHO, 2019). As principais formas clínicas da doença são cutânea (cutânea, mucocutânea e cutânea difusa) e visceral (calazar e pós-calazar) (COSTA et al., 2009; REDDY, 2019). As espécies de *Leishmania* que causam Leishmaniose na América Latina estão divididas em dois grupos: o grupo que compreende o subgênero *Viannia*, constituído pelas espécies *L. brasilienses*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*, responsáveis pelas infecções cutâneas. O outro grupo é formado pelo subgênero *Leishmania*, constituído pelas espécies *L. amazonensis* e *L. mexicana*, responsáveis pelas lesões cutâneas difusas. As espécies responsáveis pela forma visceral são *L. infantum*, *L. donovani* e *L. chagasi* (LOPES et al., 2016).

Esta enfermidade ocorre em 98 países, a maioria deles países em desenvolvimento de regiões tropicais e temperadas, com mais de 350 milhões de pessoas estando em áreas de risco. Dois milhões de casos ocorrem anualmente, dos quais 1-1,5 milhão são relacionados à leishmaniose cutânea e cerca de 500.000 casos são de leishmaniose visceral (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; REDDY, 2019). A leishmaniose cutânea é endêmica em mais de 70 países em todo o mundo, e 90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria. A forma visceral ocorre em 65 países; 90% dos casos ocorre em áreas agrícolas e entre os subúrbios pobres de cinco países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (TIUMAN et al., 2011).

Leishmaniose cutânea, a forma mais comum, possui um espectro de manifestações clínicas que vai desde pequenos nódulos cutâneos até a destruição macroscópica residual (REITHINGER et al., 2007). A leishmaniose visceral é a forma mais grave, na qual os parasitas migram para órgãos vitais causando a debilitação do paciente. Alguns dos sintomas são febre prolongada, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia. Os pacientes adoecem gradualmente por alguns meses e quase sempre morrem na ausência de tratamento (LEMOS; SOUSA; SILVA, 2019).

### **2.4.1 Ciclo de vida de *Leishmania* spp.**

Os parasitas do gênero *Leishmania* tem ciclo de vida heteroxênico, alternando entre as formas promastigotas, que são adaptadas ao ambiente extracelular, e amastigotas, adaptadas ao ambiente intracelular (Figura 06).

No hospedeiro invertebrado, a infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, durante o repasto sanguíneo, ingerem macrófagos parasitados com formas amastigotas de *Leishmania*. No trato digestivo anterior do inseto ocorre o rompimento dos macrófagos, liberando as amastigotas. No intestino do inseto, as amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas, que se reproduzem sucessivamente por fissão binária. Estas formas migram para a porção anterior do tubo digestivo, colonizando o esôfago e a faringe do vetor, enquanto se diferenciam nas formas infectantes, as promastigotas metacíclicas, através de metaciclogênese. As formas promastigotas metacíclicas são inoculadas no hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva do inseto, durante a picada. Através de endocitose, mediada por glicoconjugados presentes na superfície do parasita e receptores na superfície do macrófago, os promastigotas são internalizados por macrófagos. Dentro da célula, permanecem em vacúolos, os vacúolos parasitóforos, e se diferenciam em amastigotas, sendo capazes de controlar o pH do vacúolo. Dentro do vacúolo parasitóforo multiplicam-se intensamente até o rompimento celular, liberando estas formas para serem internalizadas por outros macrófagos, em um processo contínuo. Estas células infectadas serão ingeridas pelo vetor, iniciando um novo ciclo (CDC, 2018; ESCH; PETERSEN, 2013).

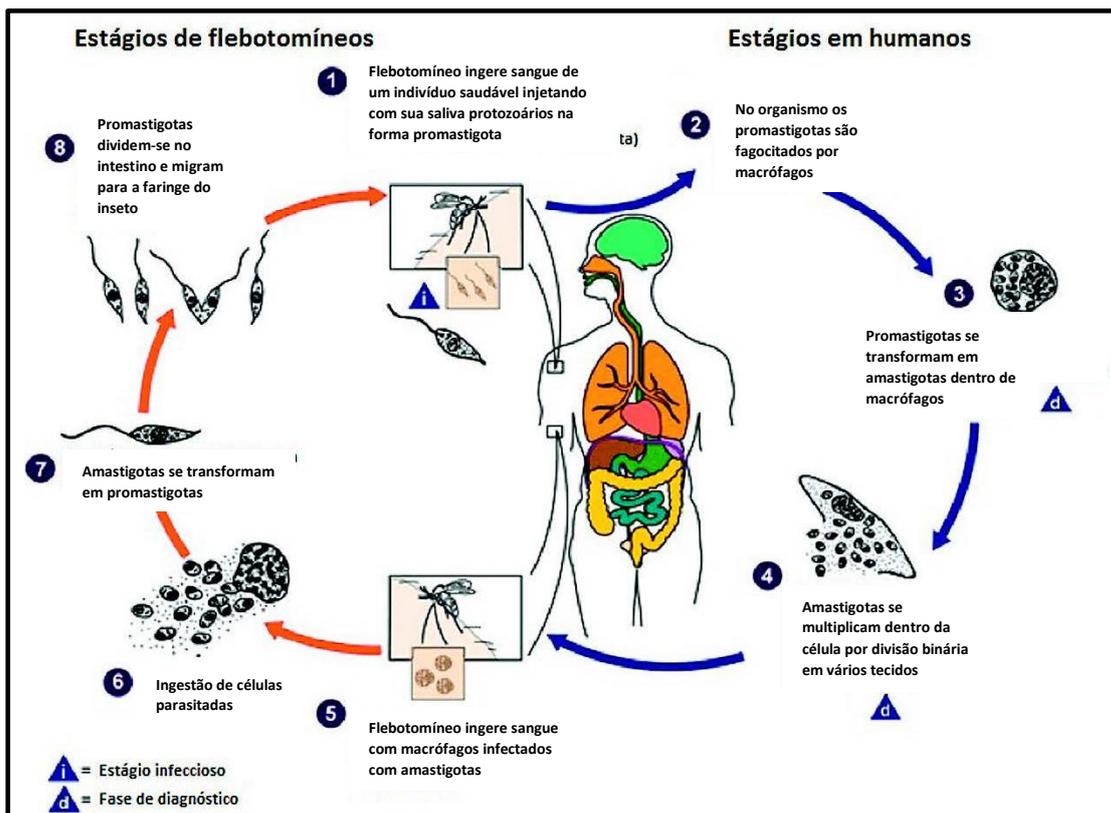


Figura 06: Ciclo de vida heteroxênico de *Leishmania* sp.  
 Fonte: <https://www.cdc.gov>

## 2.4.2 Limitações da Quimioterapia da Leishmaniose

O tratamento da leishmaniose consiste na utilização de alguns fármacos, porém são tratamentos que não são satisfatórios em termos de efetividade e toxicidade, produzindo muitos efeitos colaterais graves, além da existência de resistência do parasita às drogas existentes e a sensibilidade de diferentes cepas às mesmas (ANTINARELLI et al., 2015). Ainda, possui um alto custo e ausência de uma vacina eficaz (BLANCO; NASCIMENTO-JUNIOR, 2017).

Antimoniais pentavalentes foram desenvolvidos na década de 40 e permanecem desde então como tratamentos de primeira escolha na maioria dos países, tanto para a leishmaniose visceral quanto leishmaniose cutânea (TIUMAN et al., 2011). São considerados pró-fármacos e necessitam de redução para a forma trivalente, para exercerem a atividade biológica (CARDOSO et al., 2014). Estes medicamentos, como o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estiboglucanato de sódio (Pentostan®), que são os mais utilizados, possuem metais pesados tóxicos (COLOTTI; FIORILLO;

ILARI, 2018). Ambos possuem baixa absorção oral, necessitando de injeção intravenosa ou intramuscular. Entre os efeitos colaterais estão dor no local da injeção, articulações rígidas, problemas gastrointestinais e insuficiência hepática. Porém, seu principal problema se dá pela cardiotoxicidade e nefrotoxicidade causada, além da posologia longa e contra-indicação na gravidez (GONTIJO; MELO, 2004; GUGLIELMO; RODRÍGUEZ; OVIEDO, 2018). O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes não é elucidado, apesar de estudos sugerirem que o Pentostan® age por meio da inibição da glicólise e beta-oxidação dos ácidos graxos nas formas amastigotas (GUGLIELMO; RODRÍGUEZ; OVIEDO, 2018).

Em caso de falha no tratamento antimonial, Anfotericina B e pentamidina são agentes anti-*Leishmania* de segunda linha e exigem longos períodos de administração parenteral. Ambos são de administração injetável e necessitam de supervisão clínica devido à severidade dos efeitos colaterais (MENDONÇA et al., 2018; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2017). Anfotericina B é um agente antifúngico originalmente isolado de *Streptomyces nodosus*. Ele possui maior seletividade aos esteróis presentes na membrana da *Leishmania* spp. Esta interação leva à formação de canais transmembrana, formando poros e levando ao vazamento de cátions (ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ et al., 2007). Hipocalemia, nefrotoxicidade e miocardite são alguns dos seus graves efeitos colaterais (NIETO et al., 2017). Foram desenvolvidas formulações lipídicas de Anfotericina B, com o intuito de melhorar a eficácia e reduzir a toxicidade do fármaco. Estas formulações lipídicas mostram-se como um tratamento mais seguro e eficaz para a forma visceral da doença em países endêmicos do Sul da Ásia, onde são recomendados como tratamento de primeira linha (BALASEGARAM et al., 2012). A Pentamidina, uma diamina aromática usada principalmente para a prevenção e tratamento da pneumonia por *Pneumocystis jiroveci* (MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010), é também utilizada como agente leishmanicida. As mitocôndrias do parasita foram sugeridas como alvo de ação desse fármaco (MUKHERJEE et al., 2006). Apesar de o tratamento com Pentamidina decorrer em um espaço de tempo mais curto, este fármaco demonstra ter efeitos adversos graves, como diabetes induzida, cardio e nefrotoxicidade (TIUMAN et al., 2011).

A Miltefosina foi o primeiro fármaco anti-*Leishmania* desenvolvido para administração via oral. É um análogo da fosfocolina que foi inicialmente desenvolvido como um agente antineoplásico. Porém, este fármaco é considerado teratogênico e é

contra-indicado na gravidez. Além disso, o trato gastro-intestinal é o principal alvo dos seus efeitos tóxicos (GUGLIELMO; RODRÍGUEZ; OVIEDO, 2018).

Há outros fármacos utilizados alternativamente para o tratamento da leishmaniose, como o antibiótico paromomicina por via tópica para leishmaniose cutânea e por via injetável na forma visceral. No entanto, assim como os demais, apresenta nefrotoxicidade, ototoxicidade e disfunção hepática (BASTOS et al., 2016).

A alta toxicidade dos fármacos disponíveis e o surgimento de formas resistentes de *Leishmania* spp. impulsionam as pesquisas para o desenvolvimento de novos compostos sintéticos, semi-sintéticos ou produtos naturais (TIUMAN et al., 2011).

## **2.5 Doença de Chagas**

A Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana foi descoberta pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas em 1909. É uma enfermidade causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e a transmissão vetorial ocorre através das fezes de insetos hematófagos triatomíneos infectados pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (MENEZES et al., 2018). No entanto, a transmissão também pode ocorrer por transfusão de sangue, via placentária e transplantes de órgãos (De ALMEIDA et al., 2007). Outros mecanismos, como acidentes de laboratório e contaminação pela via oral também são relatados. A Amazônia brasileira, por exemplo, recebe atenção especial por conta da incidência de transmissão oral da doença através da ingestão de alimentos contaminados, como caldo de cana e açaí (MENEZES et al., 2018).

Esta doença afeta cerca de 8 milhões de pessoas anualmente e é endêmica em 22 países, incluindo todos os países da América Latina, com exceção do Caribe (GROOM; PROTOPAPAS; ZOCHIOS, 2017). Além disso, há relatos de casos em outros países como, Canadá, Estados Unidos, Espanha, Japão e Austrália, devido à migração de latino-americanos (MURCIA et al., 2013).



onde podem invadir novas células ou tecidos por meio da corrente circulatória. As formas tripomastigotas que se encontrarem na corrente sanguínea serão ingeridas pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo. Ao chegarem no intestino do vetor, estas formas se diferenciam em formas replicativas, as epimastigotas. Posteriormente, esses parasitas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infectivos, através de um processo chamado de metaciclogênese, e então migram para a porção posterior do intestino, para serem expelidos junto com as fezes, iniciando um novo ciclo (TYLER; ENGMAN, 2001; SCHUSTER; SULLIVAN, 2002; RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014).

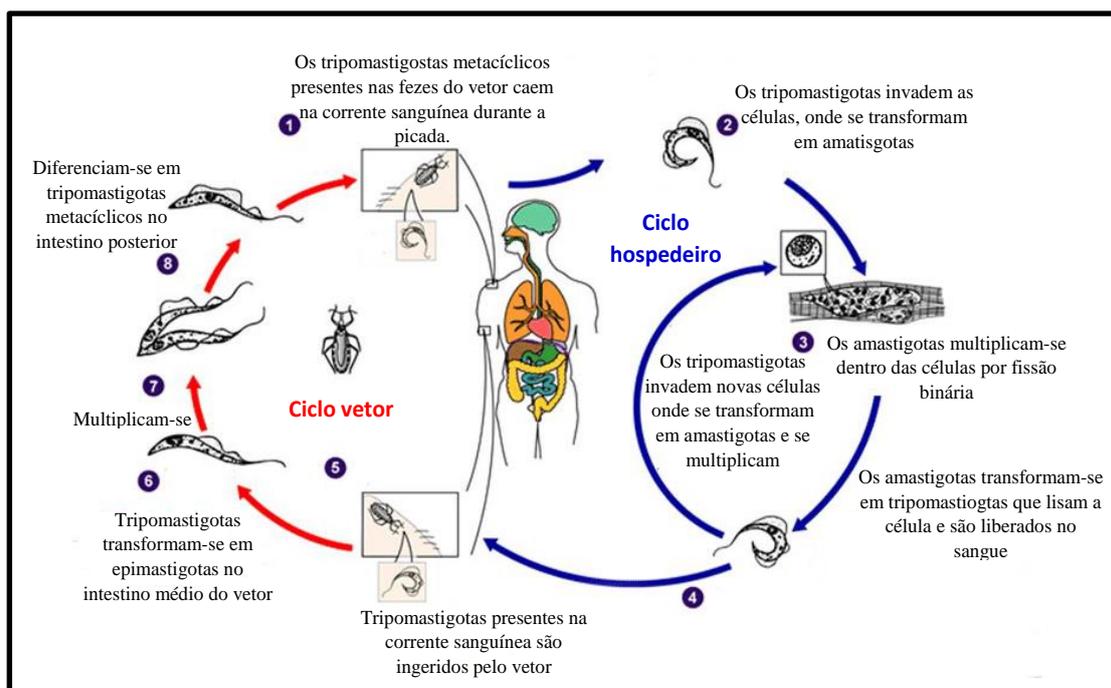


Figura 08: Ciclo heteroxênico de *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: <https://www.cdc.gov>

## 2.5.2 Desafios no Tratamento da Doença de Chagas

Benznidazol e Nifurtimox (Figura 09) são as únicas drogas com eficácia comprovada contra infecção por *T. cruzi* (COURA; CASTRO, 2002). A US Food and Drug Administration (FDA) aprovou no início do segundo semestre de 2017 o uso do benznidazol para crianças entre dois e doze anos portadores da doença. O Nifurtimox não é atualmente aprovado pela FDA, mas pode ser obtido no Centers for Disease Control and Prevention (CDC) e usado sob protocolos de investigação (CDC, 2019). No Brasil, o único medicamento utilizado e autorizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o benznidazol que é produzido pelo Laboratório Farmacêutico do

Estado de Pernambuco (LAFEPE) e distribuído gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (CABRA et al., 2019). Desde a década de 1980, o Nifurtimox teve sua comercialização interrompida no Brasil e na América do Sul (COURA; CASTRO, 2002).

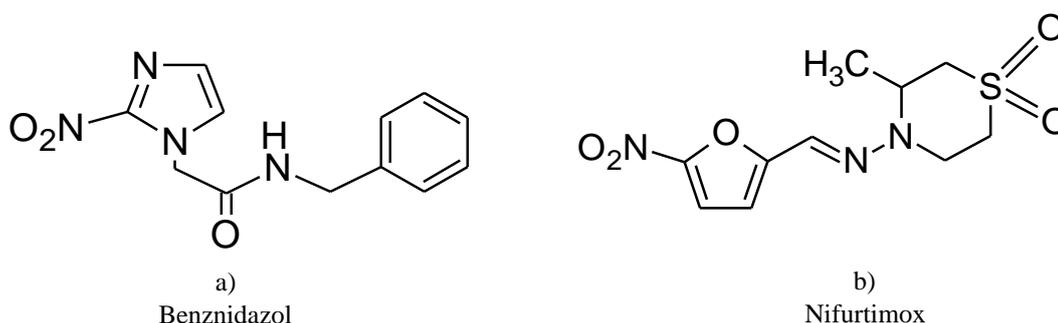


Figura 09: Estruturas químicas dos fármacos utilizados no tratamento da Doença de Chagas.

O Benznidazol (N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) é um derivado nitroimidazólico e o nifurtimox (4 [(5-nitrofurfurilideno) amino] -3-metiltiomorfolina-1,1-dióxido), um derivado do nitrofurano. O mecanismo de ação de ambos é através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. O grupo nitro dos fármacos antichagásicos é reduzido a um grupo amino pelas nitrorredutases de *T. cruzi*, levando à formação de radicais livres ou metabólitos eletrofílicos. O oxigênio produzido derivado de radicais livres e metabólitos eletrofílicos se ligam às macromoléculas intracelulares, como lipídeos, proteínas e DNA, danificando-as (MAYA et al., 2007).

O tratamento com benznidazol e nifurtimox na fase aguda da doença fornece taxas de cura de perto de 100% em bebês e em torno de 60% em crianças e adultos com infecção recente. A eficácia da terapia medicamentosa diminui com a duração da infecção e ainda é uma questão de debate na fase crônica tardia da doença de Chagas (PINAZO et al., 2010).

Ambas as drogas têm eficácia limitada e efeitos colaterais graves (KAPELUSZNIK et al., 2013). No tratamento com benznidazol, os principais efeitos colaterais são as erupções cutâneas, como hipersensibilidade, dermatite, edema generalizado, febre, linfadenopatia, dores musculares e articulares. Os efeitos adversos observados na utilização do Nifurtimox são anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade, sonolência e distúrbios digestivos (CASTRO et al., 2006). Ainda, são contra-indicados para gestantes, pacientes com problemas renais ou hepáticos (BERN, 2011). Além dos efeitos colaterais da quimioterapia e da baixa eficácia na fase crônica, a

duração do tratamento é muito longa e leva os pacientes ao abandono da medicação (GARCIA et al., 2013). Por conta do tratamento muitas vezes não ser concluído, o resultado pode ser o desenvolvimento de resistência pelo parasita (WILKINSON et al., 2008). A diferente suscetibilidade de diferentes linhagens do parasita a essas drogas também já foi relatada (FILARDI; BRENER, 1987).

Alguns fármacos já conhecidos, como os antifúngicos fluconazol, itraconazol e tipifarnib, além de substâncias naturais e sintéticas, tem apresentado inibição contra *T. cruzi* em triagens parasitárias (DIAS et al., 2009; MAYA et al., 2007). Entretanto, em ensaios clínicos os candidatos a fármacos não têm obtido sucesso. O medicamento fexinidazol, por exemplo, utilizado para o tratamento da “doença do sono”, mostrou potencial para a Doença de Chagas, porém em ensaios clínicos, apresentou toxicidade nas doses administradas (FIELD et al., 2017).

Desde a sua descoberta em 1909, nenhuma outra droga além de benznidazol a nifurtimox foi aprovada para o tratamento da Doença de Chagas, tornando clara a necessidade de novos medicamentos com eficácia em ambas as fases e em ambas as formas do parasita. Os produtos naturais e seus derivados têm sido intensamente estudados como potenciais agentes anti-chagásicos (TURNER et al., 2019). As substâncias de origem natural podem servir de protótipo para uma ampla gama de moléculas que podem ser otimizadas a ponto de inserir novos medicamentos no mercado (VARELA; FERNANDES, 2018).

## **2.6 Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos**

Produtos naturais são definidos como compostos procedentes de fontes naturais e que possuem atividade biológica (BAKER et al., 2007). As práticas da medicina tradicional serviram de base para a maioria dos medicamentos a partir de produtos naturais, incitando estudos farmacológicos, químicos e clínicos destas plantas e seus compostos. Até hoje, estes produtos continuam a fornecer modelos estruturais para o desenvolvimento de novas drogas, particularmente anticancerígenas e antimicrobianas. Os produtos naturais serviram como pontos de partida para a maioria das principais classes de antibióticos, incluindo os  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrólídeos, tetraciclina, rifampicina, glicopeptídeos, estreptograminas e lipopeptídeos (BUTLER, 2004; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Dentre os produtos naturais obtidos de plantas, certamente um dos mais conhecidos é o taxol. Paclitaxel (Taxol®) é o fármaco de câncer de mama mais utilizado e foi isolado da casca de *Taxus brevifolia* Nutt (CRAGG, 1998). Já o ácido acetilsalicílico (aspirina) é um famoso agente anti-inflamatório e foi derivado do produto natural salicina, o qual foi isolado da casca de *Salix alba* L. A morfina é um alcaloide de grande importância no tratamento de câncer e foi isolado de *Papaver somniferum* L. (papoula de ópio) (DER MARDEROSIAN; BEUTLER, 2010).

Dentre as drogas antimaláricas mais conhecidas estão a quinino e artemisinina. O quinino foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos em 2004, e foi isolado da casca de *Cinchona succirubra* Pav. Ex Klotsch. Esta planta tinha sido usada há séculos para o tratamento da malária, febre, indigestão, boca e garganta doenças e câncer (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). A artemisinina foi isolada de *Artemisia annua* L., a qual era uma planta originalmente utilizada na medicina chinesa tradicional contra febres e calafrios (NEWMAN; CRAGG, 2007). O isolamento da artemisinina tem salvado milhões de vidas, e isso destaca a importância da imensa diversidade de produtos na natureza (CALLAWAY; CYRANOSKI, 2015).

Produtos naturais inalterados continuam a desempenhar um papel importante na descoberta de medicamentos. A partir destes, também podem ser produzidos análogos e drogas sintéticas a partir do farmacóforo da molécula. Estes são obtidos por processos químicos baseados em um design racional e, muitas vezes, acabam apresentando maior eficácia, baixa toxicidade e propriedades farmacocinéticas aceitáveis. Produtos naturais e seus análogos são extremamente importantes para ilustrar a relação estrutura química e atividade biológica. O estudo desta relação é fundamental para a otimização das propriedades de compostos farmacêuticos clinicamente relevantes (LI; LOU, 2017).

Nos últimos 30 anos, a pesquisa de produtos naturais forneceu a única classe nova de drogas antifúngicas, o equinocandino (ROEMER; KRYSAN, 2014). Desde 2000, 22 novos antibióticos foram lançados para tratar infecções em seres humanos, mas apenas cinco destes representavam novas classes de compostos. Três dessas novas classes têm suas origens em produtos naturais: o lipopeptídeo daptomicina, a pleuromutilina retapamulina e a tiacumicina fidaxomicina (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Butler, Blaskovich e Cooper (2013) identificaram dezenove novas estruturas modelo que estavam em ensaios na fase clínica em 2013, das quais onze estavam relacionados a produtos naturais.

Um levantamento feito sobre novos medicamentos aprovados FDA, entre 1981 e 2014, revelou que 25% dos medicamentos que eram baseados em pequenas moléculas eram produtos naturais ou seus derivados (NEWMAN; CRAGG, 2016). A maior parte dos estudos com substâncias a partir de produtos naturais em ensaios clínicos concentra-se nos Estados Unidos e Europa (FERNANDES, 2017).

Dentre as fontes naturais, as plantas contribuíram para o desenvolvimento de mais de um quarto dos medicamentos modernos, que são derivados direta ou indiretamente de seus metabólitos, especialmente no caso de doenças infecciosas (GEORGIEV, 2014). Apesar disso, apenas uma pequena porcentagem do número total de espécies de plantas foi explorada quanto ao seu potencial farmacológico. Espécies pouco estudadas quanto à sua atividade antimicrobiana se tornam um ótimo alvo de investigação (da SILVA et al., 2019). Segundo Sharma e Sarkar (2013), as famílias Fabaceae, Asteraceae, Apiaceae, Rosaceae e Solanaceae são as principais famílias botânicas que possuem substâncias em ensaios clínicos com atividades contra agentes infecciosos.

## **2.7 A Família Lauraceae Juss.**

As plantas da família Lauraceae Juss. destacam-se entre as demais famílias pela sua importância econômica e pelo seu uso na medicina tradicional. Esta família, pertencente à divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida e ordem Laurales, apresenta-se amplamente distribuída através das regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo representada por cerca de 68 gêneros e cerca de 3.000 espécies, nas formas de árvores, arbustos e lianas (TPL, 2013). Segundo levantamento realizado no trabalho de Beech et al. (2017) é a quarta família com maior número de espécies.

No Brasil são reconhecidos 24 gêneros e 441 espécies, com ocorrências confirmadas em todas as regiões do país, sendo 231 espécies consideradas endêmicas. Dentre os gêneros presentes no Brasil estão *Persea* Mill. (22 spp.), *Ocotea* Aubl. (172 spp.), *Aniba* Aubl. (29 spp.), *Cinnamomum* Schaeff. (12 spp.), *Licaria* Aubl. (21 spp.), *Cryptocaria* R. Br. (13 spp.), *Mezilaurus* Taub. (16 spp.) e *Nectandra* Rol. ex Rottb. (46 spp.) (QUINET et al., 2015).

Um número expressivo de espécies da família apresenta uma grande diversidade de usos, com destaque para as que possuem utilização medicinal e na indústria. Algumas espécies são utilizadas na culinária como a *Persea americana* Mill. (abacate), de grande importância comercial, e *Laurus nobilis* L. (louro), cujas folhas são utilizadas como

tempero (MARQUES, 2001). Também possuem espécies aromáticas, produtoras de óleos essenciais, como o linalol em *A. rosaedora* Ducke (ALCÂNTARA et al., 2010), e espécies fornecedoras de madeira, como *Ocotea porosa* (Nees&Mart.) Barroso (imbuia) (ZANIN; LORDELLO, 2007), ambos com alto valor de mercado.

Na medicina popular, as lauráceas apresentam utilização variada, desempenhando diferentes funções contra diversas doenças. O gênero *Ocotea* apresenta o maior número de espécies medicinais, como *O. aciphylla* (Nees & Mart.) Mez e *O. pulchella* (Nees & Mart.) Mez, que são consideradas estomáquicas e tônicas (BOTEGA et al., 1993; MORAES, 2005), e *O. guianensis* Aubl., espécie típica da Amazônia, com casca e folha aromáticas, sendo empregadas pela população local contra abscessos (MORAES, 2005).

Diversos estudos já comprovaram as atividades biológicas de espécies da família, porém a maioria tem seu uso restrito às comunidades tradicionais que detêm o conhecimento empírico da utilização dessas plantas (MARQUES, 2001).

Muitas pesquisas relacionadas aos óleos essenciais das espécies aromáticas já foram e ainda são realizadas comprovando diversas atividades biológicas, como por exemplo, atividade tripanocida (GIONGO et al., 2017), antileishmania (ALCOBA et al., 2017), anti-inflamatória (AZAB; ABDEL-JALEEL; ELDAHSHAN, 2017), antibacteriana (SU; HO, 2016a), antifúngica e citotóxica (SU; HO, 2016b), antioxidante (SILVA et al., 2016) e anticolinesterase (SALLEH; AHMAD; YEN, 2015).

Algumas espécies amazônicas pertencentes aos gêneros *Nectandra*, *Licaria*, *Ocotea* e *Aniba* revelam a presença de compostos químicos denominados neolignanais. Autores sugeriram que a atividade antitumoral apresentada pelos extratos destas plantas se deve à presença e atividade destes compostos (GOTTLIEB e YOSHIDA, 1978). Além disso, lignóides também já foram relatados produzir atividade antiviral, antifúngica, antileishmania, entre outros (APERS; VLIETINCK; PIETERS, 2003).

Ainda no contexto de atividade biológica, juntamente com as neolignanais e óleos essenciais, esta família é conhecida por apresentar uma composição química rica em alcaloides (YAMAGUCHI; ALCÂNTARA; VEIGA-JÚNIOR, 2012), os quais formam um grupo grande e estruturalmente diverso (CUSHNIE; CUSHNIE; LAMB, 2014), e em consequência disso, apresentam uma vasta gama de atividades farmacológicas dependentes de sua estrutura química (KLEIN-JÚNIOR; HENRIQUES, 2017). Já foram relatadas mais de 300 estruturas alcaloídicas na família, em 21 gêneros, sendo os

alcaloides isoquinolínicos a principal classe reportada, com cerca de 287 estruturas descritas (CUSTÓDIO; VEIGA-JÚNIOR, 2014).

A literatura também relata a produção de flavonoides e estilipironas, ambos com atividades biológicas já comprovadas em pesquisas (ROSSI; YOSHIDA; MAIA, 1997; REZENDE et al., 2015; SILVA et al., 2015a).

## 2.8 O gênero *Aniba* Aubl.

O gênero *Aniba* Aubl. é representado no Brasil por 29 espécies, de um total de 48 espécies distribuídas na América Central, Antilhas e principalmente na América do Sul. O centro de diversidade das espécies encontra-se na região das Guianas e Amazônia Central (QUINET, 2005; TPL, 2013; QUINET et al., 2015).

É conhecido principalmente pelas espécies com valor econômico, como o pau-rosa, com nome científico de *A. rosaedora* Ducke. O óleo essencial desta espécie tem como constituinte majoritário, o linalol, largamente utilizado nas indústrias de perfumaria (SIMIC et al., 2004). *A. parviflora*, popularmente conhecida como “macacaporanga”, é uma espécie aromática nativa da região amazônica que também possui como composto majoritário, o linalol. Por conta disso, tem sido vista como uma espécie que pode ser utilizada em substituição ao “pau-rosa”, o qual já é considerado estar em perigo de extinção (FELSEMBURGH; PELEJA; DO CARMO, 2016).

Na medicina tradicional, algumas propriedades farmacológicas são conhecidas. É possível obter um extrato dos frutos e cálices de *A. riparia* (Nees) Mez, espécie típica da região amazônica, com atividade antibiótica comprovada contra *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staph. aureus*. Já o óleo essencial extraído de *A. canellila* (Kunth) Mez, *A. duckei* Kosterm. e *A. hostmanniana* (Nees) Mez possui atividade bloqueadora no desenvolvimento do ancilostomídeo humano (MARQUES, 2001). O chá das cascas e folhas de *A. canellila*, conhecida como “casca-preciosa”, é utilizado amplamente na medicina popular, dentre outros, contra o artrismo, sífilis, leucorréia, males do coração, analgésico, resfriados, tosses e náuseas. Seu óleo essencial é utilizado contra acnes, ferimentos, febre, dermatites e infecções (LUPE, 2007). A infusão da casca da preciosa também é utilizada como tratamento da diarreia, antiespasmódico e estimulante do sistema nervoso (SAMPAIO et al., 2010).

*A. panurensis* (Meisn.) Mez (Figura 10) é uma planta aromática abundante na região amazônica, comumente conhecido como "louro amarelo". Na medicina tradicional, suas folhas são comumente usadas como antiespasmódico, digestivo e adstringente (REZENDE et al., 2015).



Figura 10: *Aniba panurensis* na Reserva Florestal Adolpho Ducke.

Muitas pesquisas foram realizadas investigando a composição química do gênero, permitindo relacionar as atividades biológicas e usos na medicina tradicional com estes compostos.

### **2.8.1 Constituintes químicos isolados de *Aniba* e atividades biológicas**

Vários componentes químicos foram isolados nesse gênero, especialmente neolignanas, estilpironas e flavonas (ROSSI; YOSHIDA; MAIA, 1997), ésteres (GOTTLIEB; KUBITZKI, 1981), fenilpropanóides (VILEGAS et al., 1998) e sesquiterpenóides (ALCANTARA et al. al., 2010).

Uma série de trabalhos foram publicados nas décadas de 70 e 80, relatando o isolamento de neolignanas em diversas espécies de *Aniba*. Neolignanas são dímeros oxidativos de alilfenóis e propenilfenóis, entre si ou cruzados, e sem seu C $\gamma$  (C-9) oxigenado. Sabe-se que as neolignanas se acumulam em madeiras como resposta a ferimentos mecânicos ou ao ataque de micro-organismos e que exibem propriedades de defesa contra insetos. Lignóides já apresentaram diversas propriedades farmacológicas, como anti-inflamatória, antioxidante, antifúngica, antiviral, antitumoral,

imunossupressora, anti-hepatotóxica, relaxante muscular, anticonvulsivante, antiespasmódica, antialérgica, dentre outros (BARBOSA-FILHO, 2017).

Rossi, Yoshida e Maia (1997) isolaram licarina A (Figura 11.a) de *Aniba* sp., que é descrita como uma neolignana diidrobenezofurânica e já apresentou inibição contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *L. chagasi* (CALDAS, 2010) e antichagásica (MELETI, 2012). Burchelina (Figura 11.b) e guianina são duas neolignanas hexa-hidrobenezofurânicas isoladas de *A. burchelli* e *A. guianensis*, respectivamente (LIMA; GOTTLIEB; MAGALHÃES, 1972; VON BULOW et al., 1973). Estas também foram isoladas de *Aniba* sp no trabalho de Fernandes, Gottlieb e Maia (1976). Nos trabalhos de Caldas (2010) e Cabral et al. (2001), a burchelina apresentou atividade antileishmania e antitripanossoma. Um extrato alcóolico das raízes de *A. megaphylla* demonstrou atividade *in vitro* contra células derivadas do carcinoma humano da nasofaringe. O fracionamento bioguiado do extrato levou ao isolamento da megafona (Figura 11.c), uma neolignana já descrita como um composto natural com atividade antitumoral (KUPCHAN et al., 1978).

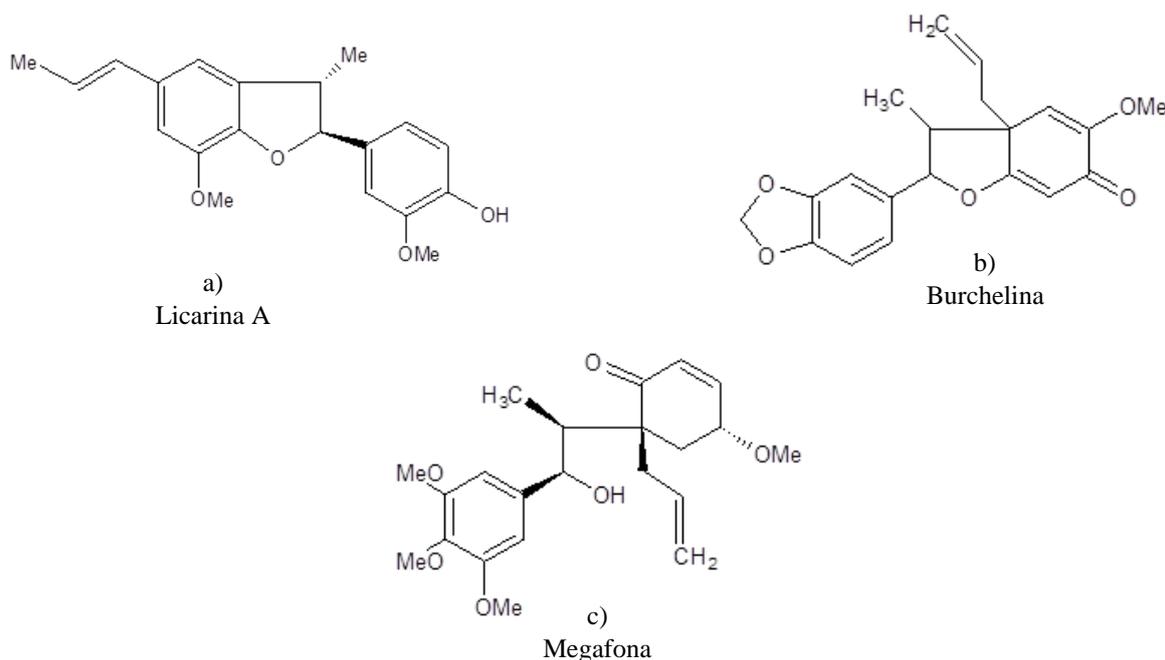


Figura 11: Estrutura química de neolignanas de *Aniba* spp com atividades biológicas.

Outra classe bastante presente em *Aniba* são os alcaloides. Alcaloides são definidos como substâncias cíclicas contendo nitrogênio, com uma grande diversidade

estrutural e possuem uma vasta gama de atividades farmacológicas dependentes de sua estrutura química (KLEIN-JÚNIOR; HENRIQUES, 2017). A biossíntese dos alcaloides é bastante complexa e variada. Assim, Aniszewski (2015) cita algumas subclasses que foram criadas a fim de agrupar as diversas estruturas que estes metabólitos podem apresentar. Dessa forma, alcaloides que derivam efetivamente de aminoácidos e possuem o nitrogênio em heterociclo são chamados de “alcaloides verdadeiros”. Aqueles que possuem o nitrogênio fora de um heterociclo são chamados de “protoalcaloides”. E por último, há o grupo dos “pseudoalcaloides” que não se originam de aminoácidos, mas sim de outras vias, como por exemplo do acetato ou chiquimato, mas que incorporam o nitrogênio por meio de outras reações. Seu potencial citotóxico a células de outros organismos já é bem conhecido, além do seu potencial antibacteriano, antifúngico e antiparasitário. São o grupo de produtos naturais mais estudados e de maior interesse farmacêutico (KLEIN-JÚNIOR; HENRIQUES, 2017).

Dentre as substâncias alcaloídicas mais estudadas no gênero estão as riparinas (Figura 12). Estas, sendo N-benzoil-tiramina (riparina I), e seus análogos substituídos (O-metil)-N-2-hidroxibenzoil-tiramina (riparina II) e (O-metil)-N-2,6-dihidroxibenzil-tiramina (riparina III), são alcaloides do tipo alcalmidas que foram isoladas do fruto verde de *A. riparia* (Nees) Mez (BARBOSA-FILHO et al., 1987). Na pesquisa de Catão et al. (2005) foi avaliada a atividade antimicrobiana das riparinas I, II e III sobre cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* multirresistentes. Neste estudo foi mostrado que apesar das três riparinas apresentarem diferenças estruturais, suas atividades antimicrobianas foram semelhantes. No entanto, a riparina III foi a que apresentou maior potencial antimicrobiano. Também se observou que as cepas de *Staph. aureus* foram mais susceptíveis à ação das riparinas do que as cepas de *E. coli*. Catão et al. (2010) demonstrou que a riparina III também apresenta atividade curagênica, eliminando a marca de resistência para a penicilina em uma linhagem de origem bovina de *Staph. aureus* designada de 319U. Além disso, foi relatada a sua capacidade de modificar a expressão de fatores de virulência da cepa. Estudos também já relataram a atividade antinoceptiva para riparina I, e atividade ansiolítica e antidepressiva para riparina II e III (MELO et al., 2011; TEIXEIRA, 2013; TEIXEIRA et al., 2013; CUSTÓDIO; VEIGA-JÚNIOR, 2014). Riparina A, um análogo sintético destas alcalmidas, apresentou uma fraca atividade antioxidante, moderada atividade citotóxica e significativa atividade antileishmanicida

sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* (SILVA et al., 2015b), além de atividade anti-inflamatória (ARAÚJO et al., 2016).

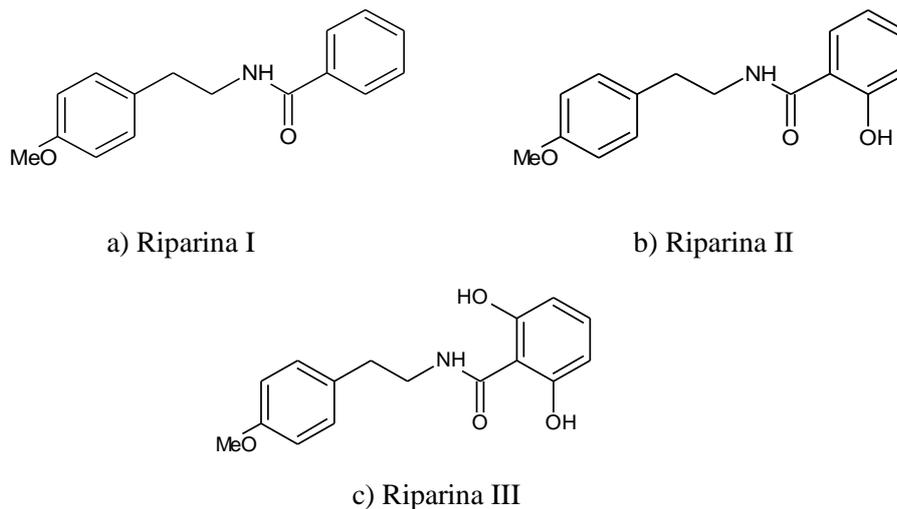


Figura 12: Estrutura química das riparinas I, II e III.

O alcaloide piridínico anibina (Figura 13.a) foi isolado de *A. panurensis* (FERNANDES, 2017), *A. rosaeodora* (MORS, GOTTLIEB E DJERASSI, 1957; DE BARROS; CORRÊA; GOTTLIEB, 1975), *A. fragans* (MORS; MAGALHÃES; GOTTLIEB, 1960) e *A. gigantifolia* (FRANCA; GOTTLIEB; SUAREZ, 1973), e já apresentou atividade analéptica (GONCALVES; CORREA FO; GOTTLIEB, 1958), além de atividade antimicrobiana contra a bactéria *Bacillus subtilis*, apresentando concentração inibitória mínima de 1 mg/mL (CUSTÓDIO, 2013). Anibamina (Figura 13.b), um alcaloide quaternário piridínico também isolado de *A. panurensis*, apresentou atividade antifúngica contra *Candida* spp. (KLAUSMEYER et al., 2004). Este alcaloide também foi isolado do extrato metanólico de *Aniba* sp. (JAYASURYIA et al., 2004) e vários trabalhos já comprovaram sua atividade antagonista contra o receptor CC-Quimiocina 5 (CCR5), se tornando o primeiro produto natural antagonista deste receptor. Um estudo de Alonzo et al. (2013) demonstrou, *in vitro* e *in vivo*, que a leucocidina ED de *Staph. aureus*, uma toxina formadora de poros, depende da presença de CCR5 para a sua citotoxicidade, relatando um novo mecanismo patogênico que pode ser alvo de investigação terapêutica. CCR5 também atua como mediador para a entrada do vírus HIV-1 em macrófagos (DRAGIC et al., 1996) e também é relatado estar envolvido no processo de proliferação de células tumorais em diversos tipos de câncer. Estudos com

anibamina e análogos mostraram inibição frente a esses receptores e, consequentemente, na proliferação de células tumorais do câncer de próstata e ovário (ZHANG et al., 2012a; ZHANG et al., 2012b; XU et al., 2015).

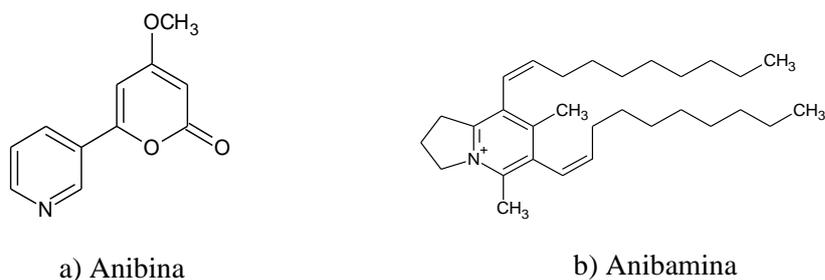


Figura 13. Estrutura química de anibina e anibamina.

A reticulina (Figura 14.a) é um alcaloide benziltetraisoquinolínico bastante encontrado no gênero *Aniba* (GOTTLIEB; KUBITZKI, 1981; SOUZA, 2014). No trabalho de Cruz (2011), este metabólito apresentou atividade antibacteriana contra bactérias gram positivas, com a concentração inibitória mínima de 100  $\mu\text{g/mL}$  contra *Staphylococcus epidermidis* se apresentando como seu melhor resultado. Além disso, também apresentou atividade antifúngica contra cepas de *Candida* spp. Outro alcaloide com bioatividade no gênero é a isoboldina (Figura 14.b), um alcaloide aporfínico que foi isolado do tronco de *A. muca* (Ruiz & Pav.) Mez (Bravo et al., 1996). Rinaldi et al. (2017) mostraram a atividade antibacteriana de uma fração, a qual tinha como composto majoritário a isoboldina, frente a *Staph. aureus* e *E. faecalis*, com CIM de 70 e 40  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Neste mesmo trabalho, foi mostrada a atividade citotóxica desta fração contra uma linhagem celular do câncer de mama (MCF-7). Além disso, este alcaloide também já apresentou atividade antioxidante, antiplasmódica (PÉREZ; SÁEZ; CASSELS, 2005) e antagonismo contra bactérias gram negativas e fungos (ORHAN et al., 2007).

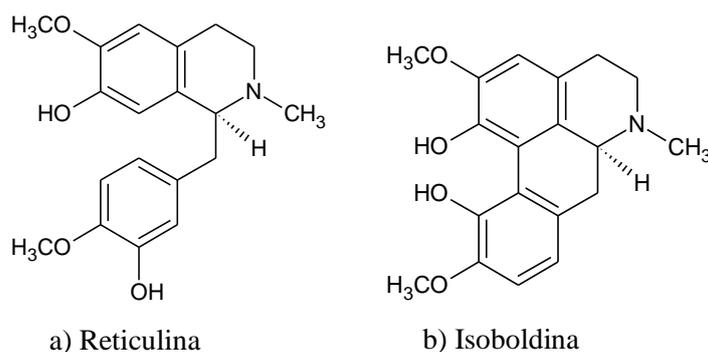


Figura 14. Estrutura química dos alcaloides reticulina e isoboldina.

As estilipironas são moléculas bastante descritas no gênero. São descritas como policetídeos aromáticos, resultantes da combinação entre as rotas biosintéticas do chiquimato com a do acetato. São formadas a partir de uma unidade de cinamoil-CoA com adição de duas unidades extensoras de malonil-CoA. Essas cadeias curtas de poli- $\beta$ -ceto, são consideradas raras e geralmente ocorre a ciclização dessas cadeias para formar lactonas (DEWICK, 2009). As estilipironas são uma classe especial de metabólitos secundários por já terem apresentado diversas atividades biológicas, como antibacteriana (REDDY et al., 2010), antifúngica (RICARDO et al., 2004; TELASCRÊA, 2006), antitumoral (TELASCRÊA, 2006; GIOCONDO et al., 2009), antiplasmódica e antileishmania (McCRACKEN et al., 2012), e tripanocida (DAVIS et al., 2010).

Estirilpironas já foram isoladas em *A. parviflora* (Meisn.) Mez (BITTENCOURT et al. 1971; REZENDE et al. 1971), *A. firmula* (Nees & Mart.) Mez (GOTTLIEB; MORS, 1959), *A. permollis* (Nees) Mez, *A. canellila* (Kunth) Mez, *A. gardineri* (Meisn.) Mez, *A. cylindriflora* Kosterm. (REZENDE et al. 1971), *A. panurensis* (Meisn.) Mez (REZENDE et al. 1971; MOTIDOME; GOTTLIEB; KUBITZKI, 1982; REZENDE et al., 2015), *A. kappleri* Mez (SANTOS; MESQUITA; GOTTLIEB, 1982) e *A. gigantifolia* O. C. Schmidt (FRANCA; GOTTLIEB; SUAREZ, 1973).

Dihidrogoniotalamina (DGT), ou apenas goniotalamina (Figura 15), é uma estilipirona que foi isolada das folhas de *A. panurensis*, e que apresentou atividade vasorelaxante no sistema cardiovascular (REZENDE et al., 2015). Esta molécula também é relatada ter propriedades anticarcinogênicas (SEYED; JANTAN; BUKHARI, 2014), além de atividade anti-inflamatória, antinociceptiva (VENDRAMINI-COSTA et al., 2015) e antifúngica (TELASCREA et al., 2005).

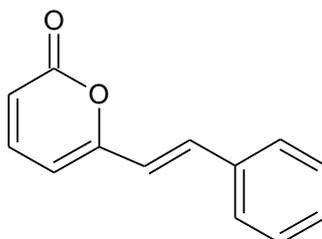


Figura 15: Estrutura química da estilipirona Dihidrogoniotalamina (DGT).

Flavonóides também já foram isolados no gênero, como a rubranina, uma chalcona isolada do tronco de *A. rosaedora* Ducke (ALLELUIA et al., 1978). Estes metabólitos também já foram isolados do tronco de *A. riparia* (FERNANDES;

GOTTLIEB; XAVIER, 1978) e *Aniba* sp. (ROSSI; YOSHIDA; MAIA, 1997). Flavokavaina B, um flavonoide isolado de *A. riparia*, já apresentou potencial antitumoral (ABU et al., 2014).

Os óleos essenciais, de uma forma geral, apresentam diversas atividades biológicas. O óleo essencial de *A. canellila*, por exemplo, mostrou-se bioativo contra *T. evansi*, assim como seus constituintes 1-nitro-2-feniletano, se apresentando como composto majoritário (83,68%), e metileugenol (14,83%) (GIONGO et al., 2017). 1-nitro-2-feniletano também já apresentou propriedades antifúngicas (OGER et al., 1994). O óleo essencial de *A. rosaeodora* Ducke apresentou potente atividade antifúngica e tem como componente majoritário, o linalol (81,27%) (SIMIC et al., 2004). Segundo a literatura, linalol tem apresentado, dentre outras atividades, atividade acaricida, fungicida, bactericida e também tem sido usado como sedativo e anticonvulsivo (CAMARGO; VASCONCELOS, 2014). No trabalho de Alcântara et al. (2010), o  $\beta$ -cariofileno se apresentou como composto majoritário do óleo essencial de *A. panurensis* (33,5%), e é relatado possuir diversas atividades biológicas, como anti-inflamatória, antialérgica, antifúngica e anticarcinogênica. Outros constituintes voláteis encontrados no gênero são benzoato de benzila (29.3%),  $\Delta$ -cadineno (12%),  $\beta$ -cariofileno (10.5%), biciclogermacreno (5.9%) e  $\alpha$ -copaeno (3.9%), que foram identificados no óleo essencial de *A. hostmanniana* (Nees) Mez, com todos apresentando atividade antibacteriana (De LIMA et al., 2015). Benzoato de benzila e salicilato de benzila mostram-se bastante presentes na composição química de diversas espécies do gênero (GOTTLIEB; SILVA; FERREIRA, 1975; FERNANDES; GOTTLIEB; MAIA, 1976; GOTTLIEB; KUBITZKI, 1981). A composição química de óleos essenciais de *Aniba* pode ser vista em diversos trabalhos, especialmente na revisão de Morais et al. (1972).

Há muitos estudos investigando a composição química das espécies e outras apresentando atividades biológicas de compostos que são encontrados no gênero. Porém o número de trabalhos publicados sobre o estudo fitoquímico e atividade antimicrobiana relacionada ainda é relativamente pequeno no gênero, especialmente com extratos. Por este motivo, o presente estudo objetiva realizar estudo fitoquímico e avaliar a atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitária de extratos, frações e substâncias isoladas de *A. panurensis*, *A. ferrea* e *A. parviflora*.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a ação antibacteriana, antifúngica e antiparasitária de extratos, frações e substâncias isoladas oriundas de *A. panurensis*, *A. parviflora* e *A. ferrea*.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a atividade antibacteriana e antiplasmódica dos extratos e fases obtidas por partição líquido-líquido, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a  $CI_{50}$ , respectivamente.
- Realizar fracionamentos bio guiados pela atividade antimicrobiana por bioautografia.
- Isolar os principais constituintes bioativos (pela bioautografia) e os majoritários presentes nas frações bioativas por técnicas cromatográficas e identificá-los por técnicas espectroscópicas e espectrométricas.
- Determinar a CIM, Concentração Bactericida Mínima (CBM) e realizar curva de tempo-morte das substâncias antibacterianas.
- Investigar modos de ação dos princípios ativos sobre as células bacterianas suscetíveis por Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Eletrônica de Transmissão.
- Avaliar a atividade das substâncias isoladas em ensaios antifúngicos e antiparasitários (anti-*Plasmodium*, anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma*), determinando a CIM e  $CI_{50}$ , respectivamente.
- Avaliar a citotoxicidade das substâncias frente a células VERO pela determinação da  $CC_{50}$ ;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Fluxo de Procedimentos

A Figura 16 ilustra, resumida e sequencialmente, as etapas cumpridas no desenvolvimento do trabalho. As etapas foram desenvolvidas no Laboratório de Pós-graduação de Produtos Naturais da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), no Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas da Amazônia, do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD-FIOCRUZ/AM), e no Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

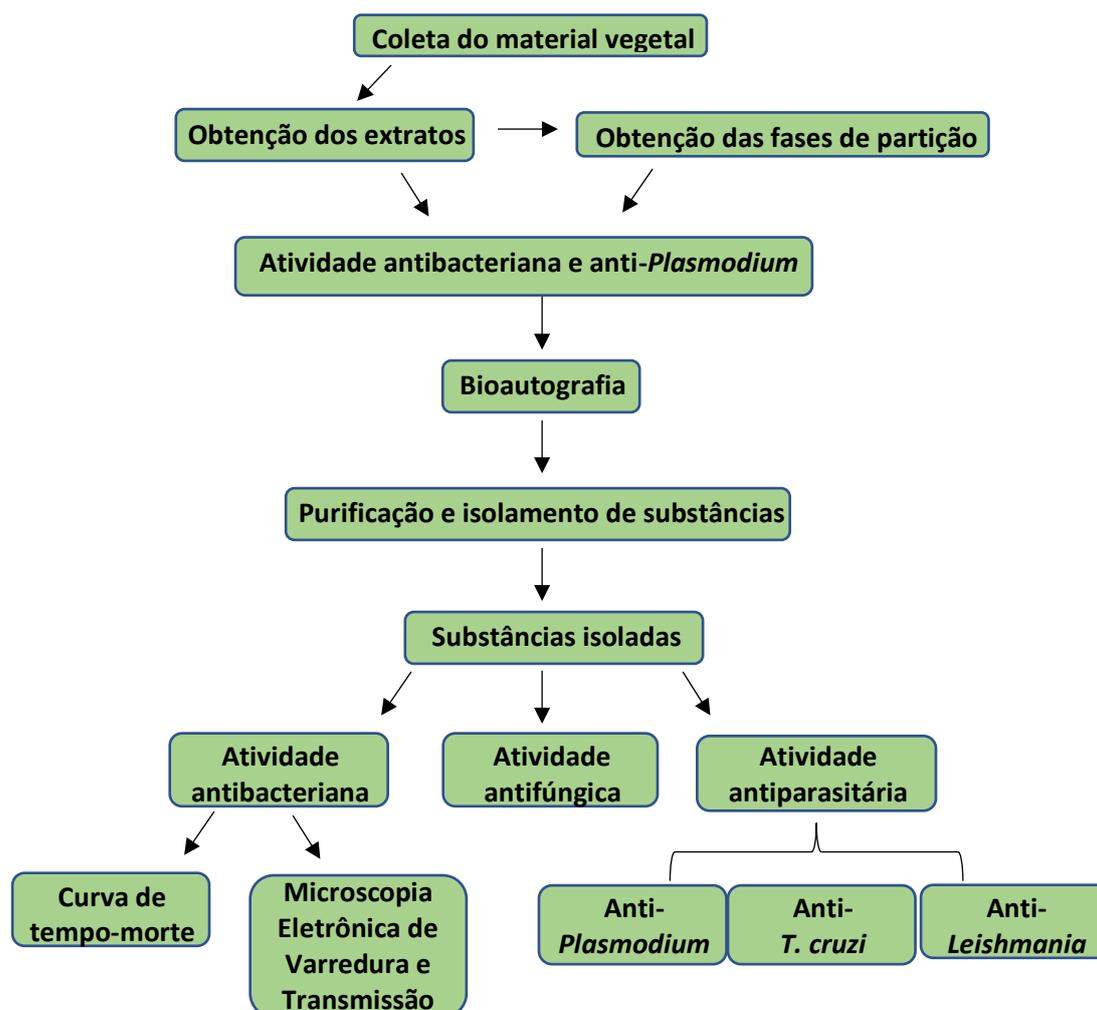


Figura 16: Fluxo de procedimentos

## 4.2 Material Botânico

Foi coletado o material vegetal de *A. panurensis*, *A. parviflora* e *A. ferrea*, na Reserva Florestal Adolpho Ducke, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, na cidade de Manaus – AM, no mês de março de 2016. Foram coletados folhas e galhos das três espécies, sendo o material vegetal de cada espécie coletado de um mesmo indivíduo (Quadro 1). As exsicatas de cada planta encontram-se depositadas no Herbário INPA.

Espécies	Marco	Número da planta	Nº Exsicata
<i>A. panurensis</i>	M534	1734	177319
<i>A. parviflora</i>	0,15 km	4453	181932
<i>A. ferrea</i>	M113	1259	177260

Quadro 1: Dados da coleta das espécies vegetais.

Após a coleta, o material foi separado, limpo e posteriormente seco a 40 °C em estufa de secagem existente na Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas - UFAM. O material vegetal seco foi triturado em liquidificador (folhas) ou moinho de facas (galhos) até a obtenção de um pó fino, que foi armazenado em sacos plásticos e de papel em freezer a 4 °C, para posterior obtenção dos extratos.

## 4.3 Obtenção dos extratos etanólicos

O material de folhas e galhos das três espécies de *Aniba* foi submetido ao processo de extração por maceração exaustiva em temperatura ambiente, com renovação do líquido extrator nos períodos de 24 e 48 horas, e posteriormente, de 72 em 72 horas por quatro vezes, sob constante agitação em shaker (BIOMIXER). Os materiais vegetais foram pesados e cada um inserido em um erlenmeyer de 1000 mL, para posteriormente adicionar-se o solvente etanol, até que este cobrisse todo o material. Os materiais foram filtrados nos intervalos de horas citados anteriormente, com o auxílio de papel filtro em um funil de vidro, submetidos à rotaevaporação (Rotavapor R-114, marca BUCHI) a 30-40 °C, à pressão reduzida, para a concentração da amostra. Esta foi submetida à evaporação em capela de exaustão até a completa eliminação do solvente. O cálculo do rendimento foi realizado através da relação da massa vegetal com a massa do extrato etanólico.

## 4.4 Partição líquido-líquido

Com a intenção de separar compostos com diferentes afinidades químicas presentes nos extratos etanólicos, estes foram submetidos a uma partição líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades: hexano (Hex), clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) e acetato de etila (AcOEt), sendo o material restante denominado de fase residual (Res). Para isso, os extratos foram ressuspensos em metanol:água (8:2) e particionados com o auxílio de um funil de separação. As partições foram realizadas na razão 1:1 com relação a cada solvente e as fases obtidas foram concentradas em rotaevaporador sob as mesmas condições de temperatura e pressão mencionadas na obtenção dos extratos (Figura 17). O cálculo do rendimento foi determinado através da relação da massa do extrato com a massa da fração obtida.

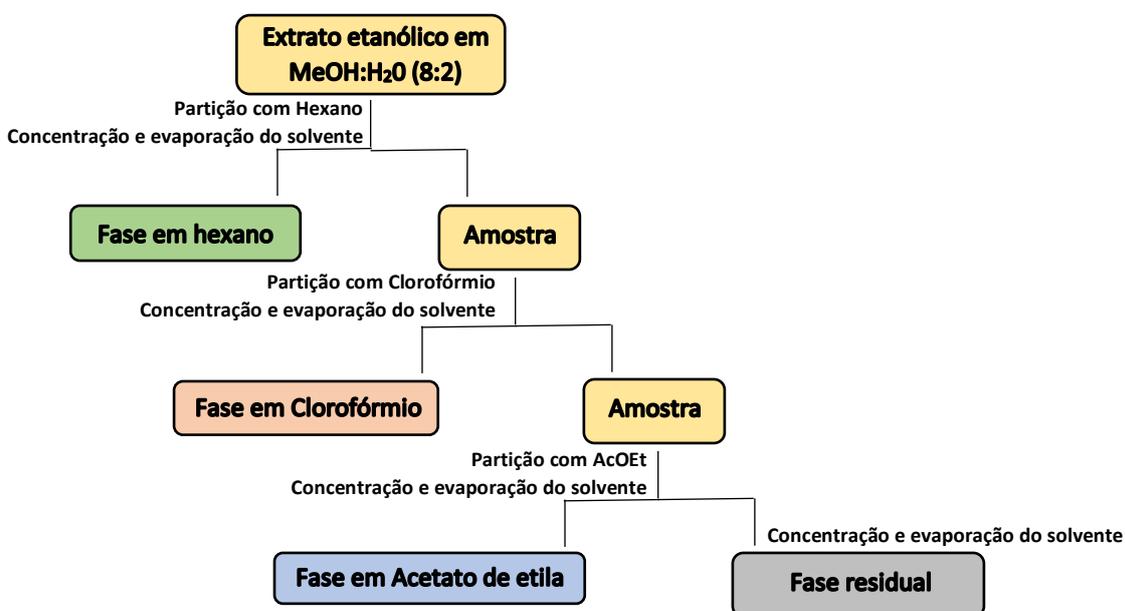


Figura 17: Metodologia da partição líquido-líquido utilizada para obtenção de frações.

## 4.5 Fracionamento por métodos cromatográficos

A purificação e o isolamento de substâncias foram realizados por meio de diferentes técnicas cromatográficas.

### 4.5.1 Cromatografia em Camada Delgada

As amostras obtidas foram analisadas primeiramente por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para a definição do melhor sistema de eluentes, com o objetivo

de otimizar a separação dos componentes da amostra e obter os perfis químicos. Para a CCD foram utilizadas placas cromatográficas de fase normal de gel de sílica (TLC Silica gel F<sub>254</sub>, Alugran, Macherey-Nagel, 20 x 20 cm). As placas de sílica foram lavadas, eluindo a placa com metanol, e depois ativadas em estufa a 100 °C por 60 minutos. Os eluentes foram preparados e testados conforme a natureza da amostra visando a melhor separação cromatográfica.

As amostras foram aplicadas na placa de CCD, eluídas em cuba saturada com o sistema de eluentes previamente selecionado e analisadas pelo equipamento CAMAG TLC Visualizer, para fotodocumentação e cálculo dos fatores de retenção ( $R_f$ 's). Como reveladores foram utilizados: luz ultravioleta (254 nm e 365 nm), vanilina sulfúrica e dragendorff. As análises de CCD foram utilizadas para monitoramento dos experimentos durante todos os processos de purificação e isolamento.

#### **4.5.2 Cromatografia em Coluna**

Após a avaliação dos melhores eluentes em CCD, ocorreu o fracionamento das amostras em colunas cromatográficas, visando a purificação e/ou isolamento de substâncias. Foi utilizada Cromatografia em Coluna Flash (CCF), que requer a utilização de um sistema de bombeamento para o empacotamento da coluna e eluição, utilizando solventes destilados da marca TEDIA.

Na CCF utilizou-se gel de sílica 230-400 mesh (SilicaFlash® F60, SILICYCLE), a qual foi adicionada a seco na coluna cromatográfica de vidro, sendo adicionado, posteriormente, o eluente para o empacotamento (primeiro eluente da corrida cromatográfica). Os sistemas de eluentes que foram utilizados como fase móvel e a forma de fracionamento (gradiente ou isocrático) foram determinados a partir das análises das amostras nas placas de CCD.

#### **4.6 Identificação de constituintes químicos**

A identificação dos constituintes químicos foi realizada pela mestre em Química Yasmin Cunha da Silva e pelo Dr. Raimundo Braz Filho, por meio de métodos espectroscópicos e espectrométricos.

##### **4.6.1 Métodos espectrométricos**

Os espectros de massas das substâncias foram obtidos no Laboratório de Espectrometria de Massas, na Central Analítica da UFAM, em um espectrômetro de massas LQC *Fleet* (Thermo Scientific®), usando fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI), nos modos positivo e negativo. As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em metanol grau CLAE (TEDIA). 20 µL destas soluções foram retirados e diluídos em 980 µL de metanol grau CLAE, para posteriormente serem submetidos às análises. Os dados obtidos das injeções foram processados através do programa *Xcalibur* 2.0.7. e comparados com os dados da literatura.

#### **4.6.2 Métodos espectroscópicos**

As substâncias isoladas foram identificadas por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensionais ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC). O espectro de COSY fornece informações sobre as interações entre  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do átomo. O espectro de HSQC e HMBC geram informações sobre as interações de  $^{13}\text{C}$  - $^1\text{H}$  (SILVERSTEIN et al., 2019).

As análises foram realizadas na Central Analítica no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UFAM, em equipamento Bruker advance III HD MhZ MRI, 500 MHz. As substâncias foram solubilizadas em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). Os dados obtidos foram processados através do programa TopSpin 3.5 e comparados com os dados da literatura para a elucidação estrutural das substâncias.

#### **4.7 Ensaios Biológicos**

##### **4.7.1 Teste de atividade antibacteriana por difusão em ágar**

Os ensaios de atividade antibacteriana foram realizados em colaboração com a Plataforma de Bioensaios do Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ Amazônia. Foram submetidas à avaliação de atividade antibacteriana cepas padrões de 31 bactérias Gram negativas e Gram positivas (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Lista das cepas bacterianas Gram negativas.

<b>Bactérias Gram negativas</b>	<b>Cepas</b>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606-143
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 43864-576
<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa (DAEC)	BUTANTÃ F1845
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	CDC EDL- O42
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	CDC EDL-933-171
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica ST (ETEC)	ST8
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica ST (ETEC)	BUTANTÃ LT 2871
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica típica (EPEC)	ATCC E234869
<i>Escherichia coli</i> -INV-enteroinvasiva (EIEC)	ATCC 1381
<i>Escherichia coli</i> não diarreicogênica	ATCC 10536
<i>Hafnia alvei</i>	ATCC 11601-120
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352-083
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 15290-095
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CDC EDL-1284
<i>Pseudomonas putida</i> (oralis)	ATCC 15175-113
<i>Salmonella arizonae</i>	UFAM
<i>Salmonella choleraesuis</i>	ATCC 10708
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 6539
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 14756-131
<i>Shigella desenteriae</i>	ATCC 13313
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610

Tabela 2: Lista das cepas bacterianas Gram positivas.

<b>Bactérias Gram-Positivas</b>	<b>Cepas</b>
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (CT)	ATCC 6051
<i>Enterococcus faecalis</i> ( <i>Streptococcus faecalis</i> )	ATCC 4083
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC 7953
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 80958
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	ATCC 33591
<i>Staphylococcus simulans</i>	ATCC 27851

Para uma análise qualitativa dos extratos e fases de partição, foi realizado o teste de difusão em ágar, onde as amostras testadas foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth) 10% na concentração de 5 mg/mL.

As bactérias foram cultivadas previamente em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (HiMedia) pelo período de 24 horas. A cultura bacteriana crescida foi diluída em meio de cultura, conforme padronização com o tubo 0,5 da escala de McFarland, que equivale a  $1 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL).

A determinação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar foi realizada pela técnica do poço, segundo Grove e Randall (1955), a qual consiste na utilização de placas com camada dupla (camada base e camada *seed*), utilizando o meio de cultura Ágar Müller Hinton (AMH) (HiMedia). Primeiramente, foi vertido o meio nas placas de Petri em duas camadas. Após a solidificação do meio de cultura, o inóculo bacteriano padronizado foi semeado com swab estéril por toda a sua superfície da placa. Em seguida, com o auxílio de ponteiros de 200 µL, foram perfurados orifícios equidistantes de aproximadamente 6 mm de diâmetro na camada superior, os quais receberam 50 µL das amostras. O controle negativo compreendeu poços contendo DMSO a 10% e a droga controle utilizada foi o TIENAM (imipenem + cilastatina sódica) na concentração de 500 µg/mL. Os ensaios foram feitos em triplicata.

Após a difusão dos metabólitos no meio de cultura, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e em seguida foi realizada a leitura do diâmetro dos halos de inibição, com o auxílio de uma régua milimetrada.

#### **4.7.2 Teste de atividade antibacteriana por microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

As amostras que apresentaram halos de inibição nos antibiogramas e as substâncias isoladas foram avaliadas para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de acordo com o manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), com modificações, em placas de 96 poços. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

As cepas que se apresentaram sensíveis às amostras foram cultivadas em 3 mL de caldo nutritivo BHI e incubadas a 37 °C por 24 horas. Para o preparo do inóculo

bacteriano, foi transferido, com o auxílio de uma micropipeta, uma alíquota da cultura para um tubo com 3 mL de meio BHI estéril, suficiente para atingir a turvação padrão de 0,5 na escala de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Após a turvação, o inóculo padronizado foi diluído em 1:10, de maneira que a concentração final nos poços-teste fosse de aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

Foram acrescentados 50  $\mu$ L do meio BHI em todos os poços. Na primeira fileira foram adicionados 50  $\mu$ L das amostras (4 mg/mL) nos poços correspondentes. Os conteúdos dos poços da primeira fileira foram homogeneizados e se procedeu uma diluição seriada (1:2) nos poços subsequentes de cada amostra, realizada até a última fileira, descartando-se 50  $\mu$ L no final. Em seguida, foram acrescentados em cada poço, 5  $\mu$ L de inóculo bacteriano e 45  $\mu$ L de caldo BHI, totalizando um volume final de 100  $\mu$ L por poço. As concentrações das amostras avaliadas foram em um espectro de 1000 a 1,95  $\mu$ g/mL. Como controle de esterilidade foi utilizado DMSO a 10% em meio de cultura, os quais foram utilizados para solubilizar a amostra, e como droga de referência foi utilizado o TIENAM. Como controle de crescimento, foi acrescentado 95  $\mu$ L de DMSO 10% em meio de cultura estéril e 5  $\mu$ L do inóculo bacteriano.

Logo após a micropipetagem, as placas foram tampadas e incubadas a 37 °C pelo período de 24 h, sem agitação. Terminado o período de incubação, foram adicionados aos poços 15  $\mu$ L de resazurina (Inlab) em solução aquosa esterilizada, a uma concentração de 0,01%. Após 4 h de reincubação, a leitura foi realizada. A resazurina facilita verificar a presença de crescimento microbiano, pois a permanência da coloração azul indica ausência de crescimento microbiano. Será considerado o crescimento bacteriano positivo quando houver a conversão do corante azul para rosa (ou incolor). A CIM é definida como a menor concentração das amostras capaz de inibir o crescimento de bactérias, como indicado pela coloração azul da resazurina.

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das substâncias isoladas, 10  $\mu$ L de cada poço teste foram semeados em placas de Petri com meio de cultura e incubados a 37 °C por 24 h. A CBM foi definida como a menor concentração da amostra capaz de impedir o crescimento bacteriano visível.

#### **4.7.3 Teste antibacteriano por Bioautografia**

O teste de bioautografia foi realizado de acordo com Valgas et al. (2007), com modificações. As amostras foram aplicadas nas placas cromatográficas na concentração

de 4 mg/mL e volume de 10 µL quando fases de partição líquido-líquido e concentração de 1 mg/mL e volume de 5 µL quando frações de coluna. Para a substância 4 e frações de onde foi oriunda, utilizou-se a concentração de 500 µg/mL. As placas foram eluídas em cubas previamente saturadas com uma combinação de solventes pré-determinada nas análises de CCD. As amostras foram corridas em duplicata na mesma placa cromatográfica; uma replicata foi utilizada como cromatograma de referência e a outra foi utilizada para bioautografia. Após a eluição, aguardou-se a total evaporação da fase móvel e as placas do cromatograma de referência foram fotodocumentadas quando reveladas em vanilina sulfúrica e luz UV (254 e 365 nm).

Para a observação de antagonismo bacteriano por bioautografia foi utilizado o meio de cultura AMH. As cromatoplasas foram depositadas em placas de Petri, onde posteriormente foi vertido o meio de cultura semeado com a suspensão bacteriana padronizada conforme tubo 0,5 da escala de McFarland. Após isso, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, para posterior observação da formação de halos de inibição.

O critério utilizado para a interpretação dos resultados foi o aparecimento de halos em torno das substâncias presentes na placa de CCD, indicando a respectiva atividade antimicrobiana. As áreas com halos de inibição foram correlacionadas com os  $R_f$ s da placa cromatográfica de referência.

#### **4.7.4 Teste antibacteriano por curva tempo-morte (*time-kill*)**

A curva de tempo-morte foi realizada para determinar o efeito bactericida ou bacteriostático da substância antibacteriana em função da concentração e do tempo, e foi realizado de acordo com Perim et al. (2018), com modificações. As bactérias testadas foram cultivadas por 24 horas em meio de cultura, e após isso foram ajustadas a uma concentração final de aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC/mL nos tubos com as amostras testadas. A substância antibacteriana foi testada em concentrações correspondentes à sua CIM: 4,0 x CIM, 2,0 x CIM, 1,0 x CIM e 0,5 x CIM. Uma cultura sem o antimicrobiano foi utilizada como controle.

Tubos contendo a solução foram incubados a 37 °C, e então, alíquotas de 100 µL foram retiradas de cada tubo teste nos intervalos de 0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas, e submetidas a diluições seriadas (1:10). Desta diluição, 100 µL foram semeados em placa de Petri com meio AMH, quando linhagens do gênero *Staphylococcus*, e meio BHI ágar,

quando *Streptococcus mutans*. As placas semeadas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e então foi realizada a contagem de colônias. A partir da contagem de colônias foi possível construir uma curva logarítmica, onde o eixo das ordenadas corresponde ao número de UFC/mL em escala logarítmica e o eixo das abscissas aos intervalos de tempo. O ensaio foi realizado em triplicata.

#### **4.7.5 Análise de alterações celulares por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As análises de MEV foram realizadas de acordo com Santos et al. (2008) e realizadas no Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

As bactérias foram coletadas em fase exponencial, cultivadas em concentração  $5 \times 10^5$  UFC/mL com a substância (0,5 x CIM) por 3 h para *Strep. mutans* e por 6 h para *Staph. aureus* e MRSA, a 37 °C. As células foram então lavadas em tampão PBS e fixadas por 1 h com glutaraldeído 2,5% em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M contendo  $\text{CaCl}_2$  1,0 mM. Após a fixação, 20  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram colocados em lamínulas com poli-L-lisina por 1 h em temperatura ambiente. Posteriormente, as lamínulas com as amostras foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90, 95, 100%), secas em ponto crítico de  $\text{CO}_2$ , revestidas com ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura Quanta 250 (FEI, Oregon, EUA).

#### **4.7.6 Análise de alterações celulares por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

As análises de MET foram de acordo com Santos et al. (2008) e realizadas no Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Para as análises em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), as bactérias analisadas foram cultivadas em meio de cultura, coletadas na fase exponencial e tratadas com a substância antibacteriana (0,5 x CIM) durante 3 h, quando *Strep. mutans*, e durante 6 h, quando *Staph. aureus* e MRSA, a 37 °C. Após isso, as células bacterianas foram coletadas por centrifugação, lavadas em 1 mL de tampão PBS (Phosphate Buffered Saline) e fixadas por imersão em glutaraldeído (EMS) 2,5% em tampão cacodilato de

sódio 0,1 M, em temperatura ambiente durante 1 h. As células foram novamente lavadas, por três vezes, em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, e em seguida, duas gotas de tetróxido de ósmio 2% e duas gotas de ferrocianeto de potássio 1,6% foram adicionadas às amostras, que foram ressuspensas e incubadas por 1 h em temperatura ambiente. Após o período, as amostras foram centrifugadas e lavadas em tampão cacodilato de sódio, desidratadas com acetona em concentrações crescentes (30, 50, 70, 90, 95, 100%) e incorporadas em resina Epon® (EMS). Aguardou-se a polimerização da resina em estufa a 60 °C durante 72 h, e então cortes ultrafinos (60-70 nm) das amostras foram feitos em um ultramicrótomo Reichert Ultracut E. Os cortes foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão JEM 1400 (JEOL, Tokyo, Japan). .

#### **4.7.7 Teste antifúngico**

As substâncias isoladas foram submetidas a testes antifúngicos, onde foram utilizados a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231) e os fungos dermatófitos *Trichophyton rubrum* (ATCC 28189), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 1481) e *Microsporum gypseum* (ATCC 14683).

A levedura foi cultivada em caldo Sabouraud-dextrose (Merck) a 37 °C por 24 h. Os fungos dermatófitos foram cultivados em Sabouraud-dextrose ágar (Merck) a 28 °C por 7 dias. Em cada cultura dos fungos dermatófitos, com auxílio de uma espátula estéril, a superfície micelial foi removida e posteriormente misturada à solução salina estéril. A suspensão foi filtrada, diluída em PBS, e então foi realizada a contagem de conídios em câmara de Neubauer.

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, em triplicata, de acordo com CLSI (2008), pela técnica de microdiluição em caldo em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) (Sigma) com L-glutamina e sem bicarbonato, e tamponado com MOPS (ácido 3-(N-morfolino propano sulfônico) até concentração final de 165 mM.

As amostras foram testadas em um espectro de 500 a 3,9 µg/mL. Para os ensaios com *C. albicans*, foram utilizados uma concentração de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Para isso, a padronização do inóculo fúngico de *C. albicans* para este ensaio foi realizado da mesma forma que a padronização das bactérias para o ensaio de CIM (Item 4.7.2) em um volume total de 100 µl. Para fungos dermatófitos, a suspensão conidial foi padronizada para aproximadamente  $10^5$  esporos/mL, e, posteriormente, foram adicionados 10 µL desta

suspensão diluída nos poços teste, que também possuía volume final de 100 µl. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h para *C. albicans* e a 28 °C por 72 h para os demais. A CIM foi definida como a menor concentração da amostra na qual o microrganismo testado não apresentou crescimento visível no poço. O antifúngico Fluconazol foi utilizado como droga de referência.

Para a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM), 10 µL de cada poço com atividade positiva foram semeados em placas de Petri com Ágar Saboraud, que foram incubadas nas mesmas condições dos ensaios de CIM. A CFM foi definida como a menor concentração da amostra capaz de inibir crescimento fúngico na placa.

#### **4.7.8 Teste de antagonismo contra *Plasmodium falciparum***

Para a avaliação da atividade antiplasmódica contra formas esquizontes do parasita, foram utilizadas cepas FRC3 de *P. falciparum* em colaboração com a Plataforma de Bioensaios e com a Plataforma de Citometria de Fluxo, ambas do Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ Amazônia.

As cepas FRC3 de *P. falciparum* foram mantidas em cultivo no meio RPMI incompleto com 10 % de soro humano AB+ e alimentadas com eritrócitos humanos normais, incubadas a 37 °C em atmosfera de baixa concentração de oxigênio e gás carbônico, seguindo a técnica de micro-aerofilia tradicional da queima de vela em dessecador. O meio de cultura RPMI 1640 incompleto foi constituído de 10,4 g de RPMI, 5,94 g de hepes, 40 mg de gentamicina, 2 g de glicose e 50 mg de hipoxantina a pH 6,8. O meio completo foi suplementado com 5 mL soro humano AB+, previamente tratado em banho-maria a 56 °C durante 30 minutos, 1 mL de NaHCO<sub>3</sub> 10 % e 44 mL de meio RPMI incompleto (LJUNGSTRÖM et al., 2004). As soluções estoque dos extratos, frações e isolados foram preparadas em DMSO e diluídas em meio completo até que atingisse a concentração final de DMSO de 0,5% nos poços, concentração em que o DMSO não inibe o crescimento parasitário. As amostras foram solubilizadas em DMSO resultando em um estoque inicial de 10 mg/mL. Deste estoque inicial, 4 µL foram retirados para diluição em 196 µL de meio completo, resultando em um segundo estoque (1:50).

Os testes foram realizados de acordo com Rabelo et al. (2014), com modificações, em placas de 96 poços em triplicata, com volume final de 100 µL/poço. Foram adicionados 50 µL de meio completo em todos os poços. Após isso, 50 µL do segundo

estoque de cada amostra foram adicionados aos poços correspondentes da fileira A da placa. Diluições seriadas das amostras (1:2) foram realizadas nas fileiras subsequentes, resultando em um espectro de análise das amostras nas concentrações de 50 a 0,39 µg/mL.

O parasita foi preparado para o teste utilizando uma solução com 100 µL de hemácias parasitadas, 100 µL de hemácias sadias, 10 µL de gentamicina e avolumado para 10 mL de meio completo, obtendo uma suspensão de parasita a 2% de hematócrito e parasitemia de 3 a 5%. Desta solução foram distribuídos 50 µL em cada um dos poços tratados com as amostras, em uma triplicata para o controle positivo (meio de cultura + parasita), em uma triplicata para o controle do reagente (meio de cultura + DMSO a 0,5% + parasita), e nos poços correspondentes à droga controle. A droga controle utilizada foi o Quinino. No controle negativo utilizou-se apenas hemácias sadias (eritrócitos não parasitados) com hematócrito a 2%. As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de baixa concentração de oxigênio e gás carbônico seguindo a técnica de micro-aerofilia tradicional da queima de vela em dessecador, mesmas condições do cultivo do parasita.

Após 72 horas de incubação, as placas foram centrifugadas à 800 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, e então os poços foram tratados por 30 minutos com 50 µL de uma solução de brometo de etídio (1:50), substância fluorescente que se liga ao DNA de células. Posteriormente, as placas foram novamente centrifugadas para descarte do sobrenadante e os poços foram lavados com 200µl de tampão PBS por três vezes. Ao final, as amostras foram ressuspensas em 200µl de PBS para a análise em citômetro de fluxo. A verificação da inibição de crescimento por citometria de fluxo foi realizada na Subunidade Citometria de Fluxo (RPT08J) - FIOCRUZ – Amazônia (ILMD), utilizando citômetro de fluxo, FACSCanto II (BD) no canal FL-1 com software Getting Started with BD FACSDiva™ e FlowJo™ versão 10.

A porcentagem de inibição das amostras foi calculada de acordo com a fórmula: % Inibição = 100 – (%Fluorescência amostra – %Fluorescência Eritrócitos sadios / %Fluorescência Controle – %Fluorescência Eritrócitos sadios) x 100]. A concentração inibitória em 50 % da parasitemia total (CI<sub>50</sub>) foi determinada pelo software Graphpad Prism 7 através de um gráfico do Log da dose *versus* inibição (expresso em porcentagem em relação ao controle) por análise de regressão não linear.

#### 4.7.9 Teste Anti-*Trypanosoma*

Os experimentos foram realizados com a cepa Y de *T. cruzi* de acordo com Peron et al. (2017). Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas em cultura axênica a 28 °C com repiques semanais em meio LIT B (CAMARGO, 1964), pH 7.4 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado. Tripomastigotas e amastigotas foram obtidas do sobrenadante de células LLCMK<sub>2</sub> (ATCC<sup>®</sup> CCL-7<sup>™</sup>), células de rim de *Macaca mulata*, previamente infectadas em meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich) suplementado com 2 mM L-glutamina, 10% SFB, 50 mg/l gentamicina e tamponado com bicarbonato de sódio. Foram mantidos em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C.

As soluções estoque dos isolados foram preparados assepticamente na concentração de 10 mg/mL em DMSO e armazenadas a -20 °C. Para os ensaios, estas soluções foram diluídas em meio de cultura adequado para que a concentração final de DMSO não ultrapassasse 1% nos experimentos, concentração que não afeta a viabilidade dos parasitos (LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013; VOLPATO et al., 2013). As amostras foram testadas frente às formas parasitárias nas concentrações de 50, 25, 10, 5 e 1 µg/mL.

Para o teste com formas epimastigotas, os parasitos foram inoculados na concentração final no poço de  $1 \times 10^6$  células/mL em meio de cultura suplementado com 10% de SFB, em placas de 96 poços estéreis. Os parasitos foram tratados com as amostras nas diferentes concentrações por 96 h a 28 °C. Após a incubação, 50 µL de uma solução de XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) (0,5 mg/mL) na presença de metossulfato de fenazina (PMS) (0,3 mg/mL) foram adicionados a cada poço, e as placas foram incubadas por mais 4 h. A leitura foi realizada em leitor de microplacas Biochrom Asys UVM 340 em 450 nm. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição em relação ao controle.

Para o teste com as formas tripomastigotas, os parasitos foram ressuspendidos em meio DMEM suplementado com 10% de SFB na concentração de  $2 \times 10^6$  parasitos/mL. 100 µL da suspensão foram adicionados em cada poço-teste da placa de 96 poços. As substâncias foram diluídas em DMEM e testadas nas diferentes concentrações. A placa foi incubada por 24 h a 37 °C. Considerando a mobilidade do parasito, o que permite distinguir sua viabilidade, foi utilizado o método Pizzi-Brener, onde uma alíquota de 5 µL de cada amostra foi adicionada em lâminas cobertas por lamínulas e contadas imediatamente em microscópio óptico. A porcentagem de inibição foi expressa em relação ao controle do parasita.

Para o teste com as formas amastigotas, primeiramente foi realizado teste de citotoxicidade com células LLCMK<sub>2</sub>, pois esta linhagem é utilizada para a obtenção das formas intracelulares de *T. cruzi*. Foi utilizado o ensaio de viabilidade celular através da redução do MTT (MOSMANN, 1983). Este método se baseia na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais em converter o sal MTT (brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio), hidrossolúvel e de coloração amarela, em cristais de formazan, insolúvel e de coloração púrpura. Para isso, células na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL, em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, foram cultivadas em placas de 96 poços e mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Após 24 h, as substâncias foram adicionadas aos poços teste em concentrações de 500 a 1 µg/mL. A placa foi em seguida incubada durante 96 h. Após o tratamento, os poços foram lavados com PBS e incubados na presença de 50 µL de MTT (2 mg/mL). Após 4 h de incubação, os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e a leitura da absorbância realizada a 570 nm em leitor de microplacas Biochrom Asys UVM 340. A porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle e a concentração citotóxica para 50% (CC<sub>50</sub>) foi determinada por análise de regressão logarítmica no software Graphpad Prism 7.

Após a determinação da CC<sub>50</sub>, células LLCMK<sub>2</sub> na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL em meio DMEM suplementado com 10% de SFB foram dispensadas em lamínulas de vidro redondas, dispostas em cada poço em placa de 24 poços e incubadas por um período de 24 h em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Após esse período, o meio foi retirado e a placa incubada por mais 24 h na presença de formas tripomastigotas de *T. cruzi* ( $1 \times 10^7$  parasitos/mL) em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após a interação entre os parasitos e as células, com a obtenção de formas amastigotas intracelulares, os poços foram lavados com PBS, e as células tratadas com as substâncias isoladas nas concentrações de 20 a 1 µg/mL. Em seguida, a placa foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 96 horas. Após esse período as células sobre as lamínulas foram fixadas com metanol por 15 minutos e coradas com solução de Giemsa 5% por 40 minutos. Então, procedeu-se a lavagem das lâminulas com água destilada e após a secagem das mesmas, estas foram fixadas sobre lâmina de vidro com resina sintética Permount® (Fisher). A visualização de pelo menos 200 células foi realizada em microscópio óptico comum e o índice de sobrevivência estabelecido multiplicando-se o percentual de células infectadas com as formas amastigotas pelo número médio de parasitos por célula.

A droga controle utilizada nos ensaios foi o Benznidazol. A concentração efetiva para 50% dos parasitos nas formas tripomastigotas ( $CE_{50}$ ), e as concentrações que inibem a proliferação de 50% dos protozoários nas formas epimastigotas e amastigotas ( $CI_{50}$ ) foram determinadas por análise de regressão linear através do software Graphpad Prism 7.

#### **4.7.10 Teste de atividade anti-*Leishmania***

Para o teste anti-*Leishmania*, a linhagem MHOM/BR/75/Josefa da espécie *L. amazonensis* foi submetida aos ensaios, que foram realizados de acordo com Moreira et al. (2019). As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram mantidas em meio Warren a 25 °C (*Brain-Heart Infusion* com hemina (10 µg/mL) e ácido fólico (10 µg/mL), pH 7.2) suplementado com 10% de SFB inativado. As soluções estoque das substâncias foram preparadas e armazenadas conforme para o teste anti-*T. cruzi*.

Neste ensaio realizado em placas de 96 poços estéreis, as substâncias foram testadas em um espectro de 50 a 1 µg/mL contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* com 48 h de cultivo e inoculadas para concentração final no poço de  $1 \times 10^6$  células/mL em meio de cultura suplementado com 10% de SFB. Em seguida, as placas foram incubadas por 72 h a 25 °C. Após a incubação, 50 µL da solução XTT/PMS (0,5 mg / mL XTT) / (0,3 mg / mL PMS) foram adicionados a cada poço, e as placas foram incubadas por mais 4 h. A leitura foi realizada em leitor de microplacas Biochrom Asys UVM 340 em 450 nm. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição em relação ao controle.

Para o teste com as formas amastigotas de *L. amazonensis*, assim como no teste com *T. cruzi*, primeiramente foi realizado teste de citotoxicidade contra células de macrófagos murinos da linhagem J774.A1 (ATCC® TIB-67), linhagem utilizada para a obtenção das formas intracelulares. O ensaio de viabilidade celular também foi realizado através da redução do MTT (MOSMANN, 1983), como descrito para a citotoxicidade em células LLCMK<sub>2</sub>. Para isso, macrófagos ( $5 \times 10^5$  células/mL), em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, foram cultivados em placas de 96 poços e mantidos a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Após isso, as substâncias foram adicionadas em diferentes concentrações de 500 a 1 µg/mL e a placa foi incubada durante 48 h. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS e incubadas na presença de MTT (2 mg/mL). Após 4 h de incubação, os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e a leitura da absorbância realizada a 570 nm em espectrofotômetro de placas Biochrom Asys UVM

340. A porcentagem de células viáveis e a  $CC_{50}$  foi determinada da mesma forma que o teste de citotoxicidade com células LLCMK<sub>2</sub>.

Após a determinação de  $CC_{50}$ , macrófagos J774.A1 foram plaqueados em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas, na concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço. As placas foram incubadas a 34 °C por 24 h e então foram adicionados promastigotas de *L. amazonensis* na concentração de  $5 \times 10^6$  parasitas/mL. A placa foi novamente incubada nas mesmas condições, e então foi lavada com PBS e tratada com as substâncias nas concentrações de 20 a 1 µg/mL. As formas parasitárias foram tratadas com as amostras por 48 h a 34 °C, e então as células sobre as lamínulas foram fixadas com metanol por 15 minutos, coradas com kit Panótico Rápido (Laborclin) e montadas sobre lâmina de vidro com resina sintética *Permount*® (Fisher). A visualização de pelo menos 200 células foi realizada em microscópio óptico comum e o índice de sobrevivência estabelecido multiplicando-se o percentual de macrófagos infectados com as formas amastigotas pelo número médio de parasitos por macrófagos.

A droga controle utilizada nos ensaios foi a Miltefosina. A  $CI_{50}$  foi determinada por análise de regressão logarítmica através do software Graphpad Prism 7.

#### **4.7.11 Testes de citotoxicidade *in vitro* frente à linhagem celular VERO**

As substâncias foram submetidas a teste de citotoxicidade com células VERO (ATCC® CCL-81TM), linhagem derivada de rins de macaco verde, utilizando o método Alamar Blue, segundo Nakayama et al. (1997). Alamar Blue, também conhecido como resazurina, é um indicador de oxirredução bastante utilizado em testes de viabilidade celular. Células viáveis e com metabolismo ativo reduzem a resazurina, de cor azul, a uma outra substância, a resorufina, que apresenta cor rosa. A quantidade de resorufina produzida é proporcional ao número de células viáveis, o que pode ser quantificado por meio de fluorescência (RISS et al., 2016).

As células foram incubadas em placas de fundo chato de 96 poços em meio DMEM contendo 10% de SFB, 50 µg/mL de gentamicina (GIBCO) a 37°C em estufa a 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^4$  células/poço, cada poço contendo 100 µL da solução. As amostras foram solubilizadas em DMSO em uma concentração inicial de 10 mg/mL. Após 24 horas de incubação e aderência das células na placa, as mesmas foram tratadas com as amostras diluídas em meio de cultura para as

concentrações finais de 500, 200, 100, 50 e 25 µg/mL. A incubação das células tratadas com as amostras ocorreu durante um período de 48 horas.

A porcentagem de viabilidade celular frente às amostras foi avaliada por leitura de fluorescência no Laboratório de Atividade Biológica (BIOPHAR II) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) – UFAM. Após o período de tratamento, foram adicionados 10 µL de resazurina 0,4% (diluída 1:20). Aguardou-se o período de metabolização da resazurina padronizada, que compreende 2 horas, e então foi realizada a leitura da fluorescência a 540 nm em espectrofotômetro Multimode Detector DTX 800 Beckman Coulter. A porcentagem da viabilidade celular foi calculada em relação ao controle da célula e a concentração citotóxica para 50% (CC<sub>50</sub>) foi determinada por análise de regressão não linear no software Graphpad Prism 7. O teste foi realizado em triplicata.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Rendimento dos extratos etanólicos e fases obtidas por partição líquido-líquido

Dentre os extratos de folhas e galhos de todas as espécies, o maior rendimento foi obtido a partir do material de folhas de *A. panurensis*, e o menor rendimento ocorreu no material de galhos de *A. panurensis* e *A. parviflora*. *A. panurensis* também apresentou maior diferença de rendimento quando comparado ao rendimento de folhas e galhos (Tabela 3).

Tabela 3: Rendimento de extratos etanólicos de folhas e galhos de *A. panurensis*, *A. parviflora* e *A. ferrea*.

Espécie	Parte da planta	Material vegetal (g)	Extrato obtido (g)	Rendimento (%)
<i>A. panurensis</i>	folhas	1612,6	143,03	8,8
	galhos	1766,03	38,6	2,1
<i>A. parviflora</i>	folhas	1211,9	77,6	6,4
	galhos	3685,9	78,1	2,1
<i>A. ferrea</i>	folhas	1280,02	59,4	4,6
	galhos	795,05	38,7	4,8

Os extratos etanólicos foram submetidos a partições líquido-líquido com solventes em ordem crescente de polaridade: hexano (Hex), clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) e acetato de etila (AcOEt), sendo a fase hidroalcóolica restante nomeada fase residual (F. Residual).

Na espécie *A. panurensis*, a fase hexânica apresentou maior rendimento tanto em folhas quanto em galhos. Mais de 75% do rendimento em folhas foi obtido nas duas fases mais apolares, com 54% do rendimento total na fase hexânica. Nos galhos, apesar da fase em hexano ter apresentado o maior rendimento, observou-se uma desigualdade menor com relação às fases de maior polaridade. As folhas de *A. parviflora* apresentaram um maior rendimento na fase em  $\text{CHCl}_3$  (53,22 %) seguida pela fase hexânica (21,46 %). Em contrapartida, nos extratos de galhos o maior rendimento foi de compostos mais polares presentes na fase residual, com 42,54 % de rendimento. Em folhas de *A. ferrea*, as fases obtidas não apresentaram grandes diferenças com relação ao rendimento. Ao contrário das folhas, o rendimento em galhos foi majoritariamente da fase residual (hidroalcóolica), com 74,01 % (Tabela 4).

Tabela 4: Rendimento de fases obtidas por partição líquido-líquido de folhas e galhos de *A. panurensis*, *A. parviflora* e *A. ferrea*.

Espécie	Parte da planta	Rendimento das fases (%)			
		Hex	CHCl <sub>3</sub>	AcOEt	F. Residual
<i>A. panurensis</i>	Folhas	54,45	20,81	6,96	12,61
	Galhos	30,43	24,25	20,38	20,97
<i>A. parviflora</i>	Folhas	21,46	53,22	8,11	13,28
	Galhos	17,1	18,32	22,01	42,54
<i>A. ferrea</i>	Folhas	26,03	17,55	23,52	25,68
	Galhos	3,21	4,19	9,48	74,01

## 5.2 Testes biológicos com extratos e fases obtidas por partição líquido-líquido

Os extratos etanólicos obtidos por maceração e fases obtidas por partição líquido-líquido foram submetidos a um *screening* biológico contra uma ampla gama de bactérias e contra o parasita *P. falciparum*, a fim de identificar amostras com maior potencial antimicrobiano.

### 5.2.1 Teste antibacteriano dos extratos e fases de partição por difusão em ágar e microdiluição em caldo

Inicialmente, os extratos etanólicos e suas fases em diferentes polaridades foram submetidos a um teste antibacteriano qualitativo por difusão em ágar contra oito bactérias gram positivas e vinte e três bactérias gram negativas.

Entre as três espécies apenas amostras de *A. panurensis* exibiram bioatividade. Os extratos etanólicos e fases em hexano e clorofórmio de folhas e galhos de *A. panurensis* apresentaram halos de inibição contra cinco bactérias gram positivas: *B. subtilis*, *Strep. mutans*, *Staph. simulans*, *Staph. aureus* e *Staph. aureus* resistente à metilina (MRSA). A fase em acetato de etila do extrato etanólico de galhos apresentou pequenos halos de inibição contra as linhagens de *Staph. aureus* e MRSA.

As fases hexânicas, tanto em folhas quanto em galhos, apresentaram um maior halo com relação às outras amostras frente às cepas do gênero *Staphylococcus*, sendo o maior halo observado na fração hexânica de galhos, com 30 mm de diâmetro frente à *Staph. simulans*. Com relação à cepa de *B. subtilis*, os maiores halos foram dos extratos etanólicos e frações em hexano de folhas e galhos (Tabela 5).

Tabela 5: Média dos halos de inibição  $\pm$  desvio padrão de amostras de folhas e galhos de *A. panurensis* frente às bactérias *B. subtilis*, *Strep. mutans*, *Staph. simulans*, *Staph. aureus* e MRSA.

Parte da planta	Amostra	Halos de inibição (mm)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>Strep. mutans</i>	<i>Staph. simulans</i>	<i>Staph. aureus</i>	MRSA
Folhas	Extrato ETOH	12 $\pm$ 0,5	10 $\pm$ 1,0	22 $\pm$ 1,5	20 $\pm$ 1,1	19 $\pm$ 0,5
	Fase Hex	12 $\pm$ 0,5	19 $\pm$ 1,0	25 $\pm$ 1,0	22 $\pm$ 1,0	22 $\pm$ 0,0
	Fase CHCl <sub>3</sub>	9 $\pm$ 1,0	9 $\pm$ 0,0	12 $\pm$ 0,0	13 $\pm$ 1,0	12 $\pm$ 0,5
	Fase AcOEt	-	-	-	-	-
	Fase Residual	-	-	-	-	-
Galhos	Extrato ETOH	13 $\pm$ 0,5	18,0 $\pm$ 0,0	22 $\pm$ 1,0	22 $\pm$ 0,0	19 $\pm$ 1,0
	Fase Hex	13 $\pm$ 0,0	26,5 $\pm$ 2,1	30 $\pm$ 0,5	23 $\pm$ 1,0	25 $\pm$ 0,0
	Fase CHCl <sub>3</sub>	11 $\pm$ 0,5	17 $\pm$ 1,0	20 $\pm$ 1,0	20 $\pm$ 1,0	22 $\pm$ 0,5
	Fase AcOEt	-	-	-	10 $\pm$ 0,5	10 $\pm$ 0,0
	Fase Residual	-	-	-	-	-
	TIENAM	30 $\pm$ 2,0	39 $\pm$ 1,0	29 $\pm$ 2,6	39 $\pm$ 1,5	34 $\pm$ 2,0

(-): não exibiram halos de inibição.

As amostras de *A. panurensis* que exibiram atividade positiva no teste de difusão em ágar foram submetidas ao teste de suscetibilidade antibacteriana por microdiluição em caldo, para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os resultados podem ser observados na Tabela 6.

O extrato etanólico de galhos exibiu a menor CIM frente à *Staph. aureus* e *Staph. simulans*, assim como a sua fase hexânica frente às três cepas de *Staphylococcus* e *Strep. mutans*. Quanto ao extrato e fase hexânica de folhas, ambos exibiram CIM de 15,62  $\mu$ g/mL contra as linhagens estafilocócicas e estreptocócicas. Dentre as fases em CHCl<sub>3</sub>, a fase oriunda do extrato etanólico de galhos apresentou boa atividade, com CIMs que variaram de 7,8 a 15,62  $\mu$ g/mL frente às cepas de *Staphylococcus* e 31,25  $\mu$ g/mL frente a *Strep. mutans*. A fase em acetato de etila de galhos de *A. panurensis*, que produziu halos contra as bactérias *Staph. aureus* e MRSA no teste de difusão em ágar, apresentou fraca atividade contra as duas bactérias. O melhor resultado contra *B. subtilis* foi obtido da fase hexânica de galhos, com CIM de 15,62  $\mu$ g/mL.

Tabela 6: Concentração Inibitória Mínima das amostras de folhas e galhos de *A. panurensis* ( $\mu\text{g/mL}$ ) frente às bactérias *B.subtilis*, *Strep. mutans*, *Staph. simulans*, *Staph. aureus* e MRSA.

Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	Amostra	<i>B. subtilis</i>	<i>Strep. mutans</i>	<i>Staph. simulans</i>	<i>Staph. aureus</i>	MRSA
<b>Folhas</b>	Extrato ETOH	500	250	15,62	15,62	15,62
	Fase Hex	31,25	15,62	15,62	15,62	15,62
	Fase $\text{CHCl}_3$	1000	250	125	125	250
<b>Galhos</b>	Extrato ETOH	250	31,25	7,8	7,8	15,62
	Fase Hex	15,62	7,8	7,8	7,8	7,8
	Fase $\text{CHCl}_3$	62,5	31,25	7,8	7,8	15,62
	Fase AcOEt	NT	NT	NT	500	500
	TIENAM	0,12	0,06	0,06	0,06	0,06

NT= não testada.

De acordo com Mahamat et al. (2019), uma CIM < 62,5  $\mu\text{g/mL}$  representa muito boa atividade antimicrobiana, CIM > 62,5 e  $\leq 125 \mu\text{g/mL}$  boa atividade, CIM > 250 e  $\leq 500 \mu\text{g/mL}$  moderadamente ativa e CIM > 500  $\mu\text{g/mL}$ , pouco ativa. As fases em hexano e clorofórmio, especialmente as oriundas dos galhos, exibiram alta atividade antibacteriana, tornando-se um ótimo objeto de estudo para o isolamento de substâncias antimicrobianas.

Souza (2014) avaliou a atividade antibacteriana das três espécies de *Aniba* utilizadas neste trabalho, e também coletadas no período que compreende o mês de março, porém nos anos de 2008 e 2009. *A. panurensis* foi a única planta bioativa, assim como no presente estudo. Os extratos etanólicos de folhas e galhos apresentaram halos de inibição contra cinco bactérias gram positivas (*B. subtilis*, *Strep. agalactiae*, *Staph. simulans*, *Staph.aureus* e MRSA) e apenas uma bactéria gram negativa (*Acinetobacter baumannii*). Porém, a fração alcaloídica e um alcalóide isolado dos galhos apresentaram bioatividade apenas contra as bactérias gram positivas *B. subtilis*, *Staph. simulans*, *Staph.aureus* e MRSA. As CIMs dos extratos etanólicos de folhas e galhos foram avaliadas em um espectro de 5000 a 600  $\mu\text{g/mL}$ , onde ambos apresentaram atividade na menor concentração testada, exceto para a bactéria *Staph. aureus*, para a qual foi apresentada CIM de 2,5 mg/mL.

No trabalho de Bastos (2015), as três espécies, coletadas em novembro de 2013, exibiram os melhores resultados para a continuidade dos estudos, especialmente *A. panurensis*. Os extratos etanólicos e as frações alcaloídicas de folhas e galhos foram ativos para as mesmas bactérias quando comparados ao trabalho de Souza (2014). Porém,

a fase obtida em acetato de etila e a fase residual exibiram halos de inibição específicos para as bactérias gram positivas. Além de *A. panurensis*, amostras de *A. ferrea* e *A. parviflora* também produziram halos de inibição contra bactérias gram positivas e uma gram negativa, neste caso *Salmonella choleraesuis*. A atividade antibacteriana dos extratos etanólicos de folhas e galhos de *A. panurensis* foram avaliados em um espectro de 1000 a 1,95 µg/mL, e apresentaram CIMs de 62,5 µg/mL contra MRSA, *Staph. simulans* e *B. subtilis*, e 250 µg/mL frente à *Staph. aureus*. As fases em AcOEt mostraram boa atividade contra *Staph. aureus* (CIM 31,25 µg/mL) e a fase residual de folhas exibiu apenas baixo potencial contra *Staph. simulans*.

Tanto este trabalho quanto os trabalhos de Souza (2014) e Bastos (2015) utilizaram plantas coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, do INPA, na cidade de Manaus e tiveram as amostras testadas a partir de 5 mg/mL. Os resultados obtidos neste estudo foram semelhantes aos resultados de Souza (2014), onde apenas *A. panurensis* apresenta potencial antibacteriano dentre as três espécies de *Aniba* investigadas. Ao contrário do trabalho de Bastos (2015), as fases mais polares de *A. panurensis* não exibiram nenhuma atividade e amostras de *A. parviflora* e *A. ferrea* também não produziram halos de inibição.

Há uma dificuldade de comparação de resultados quando se avalia atividade antimicrobiana de extratos, pois há muitas variáveis, como aspectos climáticos que influenciam a composição química, o estágio de desenvolvimento do vegetal a ser coletado, parte da planta estudada, forma de preparar o material a ser pesquisado e os protocolos seguidos nos experimentos (AURICCHIO; BACCHI, 2003). Diferenças nos resultados também podem ocorrer devido à sazonalidade na região amazônica. É relatada a influência dos fatores ambientais na produção dos compostos secundários das plantas, resultando em produtos vegetais com diferentes composições químicas, e, com isto, capacidades distintas para inibição de crescimento microbiano. A quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. São relatadas, por exemplo, variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários (GOBBO-NETTO; LOPES, 2007).

Em ambos os trabalhos é observada uma especificidade da atividade dos metabólitos de *A. panurensis* para bactérias gram positivas, especialmente para o gênero *Staphylococcus*. A ausência de uma membrana externa em bactérias gram positivas, esta presente em cepas gram negativas, resulta em uma maior sensibilidade a muitos antimicrobianos (ADESOKAN; AKANJI; YAKUBU, 2007). Apesar disso, bactérias

gram positivas, especialmente estafilocólicas, são um grande problema para a saúde no mundo, devido à sua alta capacidade de adquirir resistência (KRISHNA et al., 2019).

### 5.2.2 Teste antiplasmódico de extratos e fases de partição

Os extratos etanólicos e suas respectivas fases obtidas por partição foram avaliados contra a linhagem FRC3 de *P. falciparum*, uma cepa cloroquina resistente. Os valores de  $CI_{50}$  podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7: Valores de  $CI_{50}$  de extratos e fases de *A. panurensis*, *A. parviflora* e *A. ferrea*.

Espécie	Amostra	Folhas ( $CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ )	Galhos ( $CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ )
<i>A. panurensis</i>	Extrato ETOH	35,21	34,5
	Fase Hex	15,08	20,54
	Fase $\text{CHCl}_3$	42,79	31,48
<i>A. parviflora</i>	Extrato ETOH	29,03	-
	Fase Hex	35,87	47,58
	Fase $\text{CHCl}_3$	42,86	33,48
<i>A. ferrea</i>	Fase $\text{CHCl}_3$	43,72	48,32

$CI_{50}$  Quinino (droga controle): 0,1  $\mu\text{g/mL}$

Dentre amostras de *A. panurensis*, os extratos etanólicos de folhas e galhos e suas fases hexânicas e clorofórmicas foram ativas. A fase hexânica de folhas apresentou o melhor resultado dentre todas as amostras testadas, com  $CI_{50}$  de 15,08  $\mu\text{g/mL}$ , seguida da fase hexânica de galhos, que obteve  $CI_{50}$  de 20,54  $\mu\text{g/mL}$ . As demais amostras apresentaram  $CI_{50}$  que variaram de 31 a 42  $\mu\text{g/mL}$ . Dentre os extratos de *A. parviflora*, apenas o extrato de folhas apresentou atividade, com  $CI_{50}$  de 29,03  $\mu\text{g/mL}$ . As suas fases em hexano e  $\text{CHCl}_3$  de folhas e galhos obtiveram  $CI_{50}$  que variaram de 33 a 47  $\mu\text{g/mL}$ . Das amostras de *A. ferrea*, apenas suas fases obtidas em  $\text{CHCl}_3$  (folhas e galhos) apresentaram inibição parasitária nas concentrações testadas.

Considerou-se uma boa atividade antiplasmódica, amostras que apresentaram  $CI_{50} < 10$   $\mu\text{g/mL}$ . Valores de  $CI_{50}$  entre 10 e 100  $\mu\text{g/mL}$  foi considerado como atividade moderada e acima de 100  $\mu\text{g/mL}$  baixo potencial (AMARANTE et al., 2011). Partindo deste princípio, pode-se considerar que todas as amostras supracitadas exibiram potencial antiplasmódico moderado frente a esta linhagem.

Bastos (2015) também avaliou a atividade antiplasmódica de folhas e galhos das três espécies nas mesmas concentrações, porém nenhuma das espécies apresentou atividade. Essa diferença pode ter se dado ao período de coleta das plantas e também à diferença nas linhagens testadas, uma vez que no trabalho anterior foi utilizada a linhagem 3d7gfp de *P. falciparum*.

### **5.3 Bioautografia das fases Hex e CHCl<sub>3</sub> de folhas e galhos de *A. panurensis***

A bioautografia é uma técnica híbrida que utiliza placas de CCD acopladas a ensaios antibacterianos. É simples, eficaz e barata, consistindo na separação de constituintes de uma mistura complexa e, ao mesmo tempo, localizando constituintes ativos na placa de CCD. Sua principal vantagem para outros métodos, é que esta é uma técnica que obtém resultados rapidamente para uma triagem de um grande número de amostras, nas quais serão realizados fracionamentos bioguiados, norteados esses fracionamentos (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

A partir dos resultados obtidos do *screening* de extratos e frações de partição, foi observado um alto potencial de *A. panurensis* para a atividade antibacteriana, especialmente de suas fases em hexano e clorofórmio. Por conta disso, estas amostras foram submetidas a ensaios de bioautografia, a fim de nortear futuros isolamentos de substâncias antibacterianas.

Foram realizados testes de bioautografia das fases em hexano e clorofórmio contra as bactérias *Staph. aureus*, MRSA e *Staph. simulans*. Os resultados obtidos das frações foram semelhantes, quando comparadas as três linhagens testadas, com formação de halos nos mesmos Rfs, inclusive a linhagem MRSA, que é a cepa de maior importância clínica.

A fase em hexano de folhas de *A. panurensis* foi eluída duas vezes em Hex:AcOEt (3:7) e produziu halos nos Rfs de 0,18 a 0,58, principalmente, na faixa que envolve as duas bandas azuis presentes nos Rfs 0,47 e 0,54 na leitura em UV 365 nm e Rf 0,50 em UV 254 nm (Figura 18).

A fase em CHCl<sub>3</sub> de folhas foi eluída em Hex:AcOEt (1:9) e produziu halos em torno das bandas majoritárias azuis em UV 365 nm, e que compreenderam os Rfs 0,44 a 0,84 em todos os reveladores (Figuras 19). Esta fração também foi eluída em DCM:MeOH 9:1, com a finalidade de identificar possível atividade em substâncias mais polares. Nesta fração foi observado um halo em uma banda com menor absorção nos reveladores utilizados, que compreende o Rf 0,49 frente à bactéria *Staph. simulans*.

(Figura 20). Esta bactéria é pertencente ao grupo de estafilococos coagulase-negativa (ECN) e reportada estar envolvida em diversas infecções em humanos, como infecções oftalmológicas (OLIVEIRA et al., 2007), na pele e tecidos moles (SHIELDS; TSCHETTER; WANAT, 2016) e pneumonia (CUNHA et al., 2002). A formação deste halo neste Rf, que possui pequena mancha vermelha em UV 365 nm, foi o único que diferiu dos demais resultados de bioautografia entre as três bactérias.

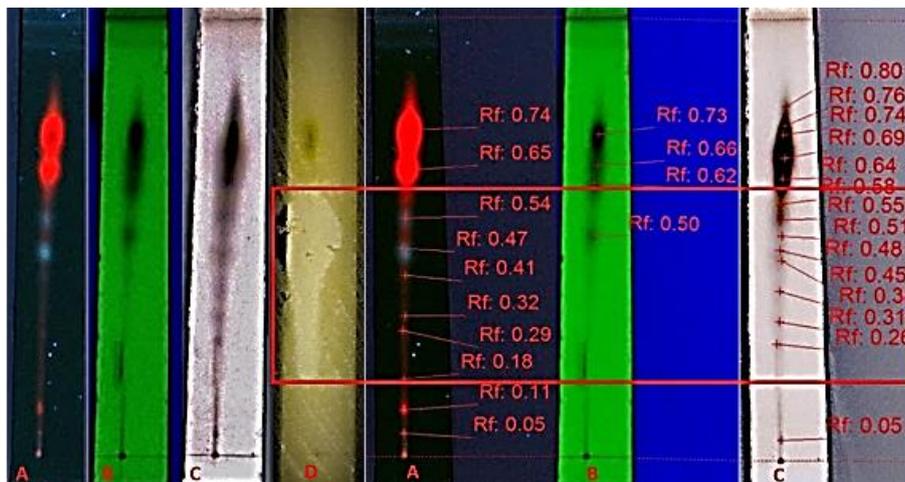


Figura 18: Bioautografia da fase hexânica de folhas de *A. panurensis* eluída duas vezes em Hex:AcOEt (3:7) frente à MRSA. A= UV 365 nm; B= UV 254 nm; C= revelador vanilina sulfúrica; D= teste de bioautografia.

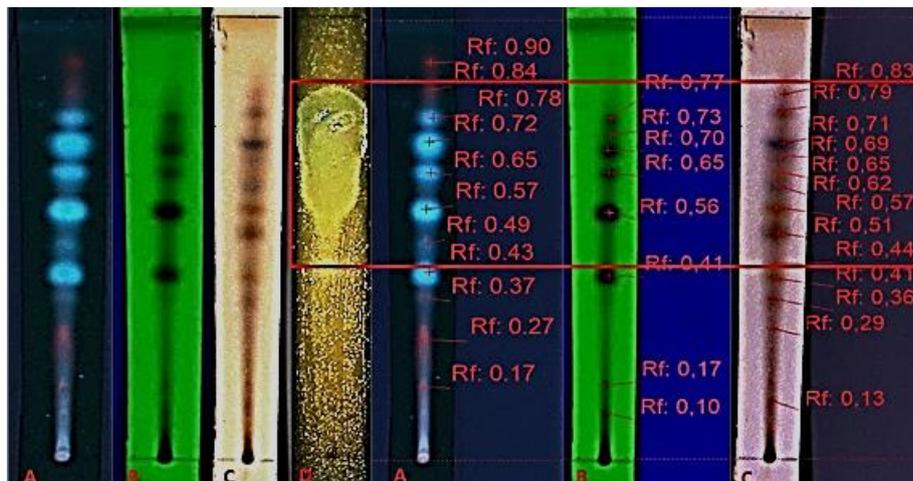


Figura 19: Bioautografia da fase  $\text{CHCl}_3$  de folhas de *A. panurensis* eluída duas vezes em Hex:AcOEt (1:9) frente à MRSA. A= UV 365 nm; B= UV 254 nm; C= revelador vanilina sulfúrica; D= teste de bioautografia.

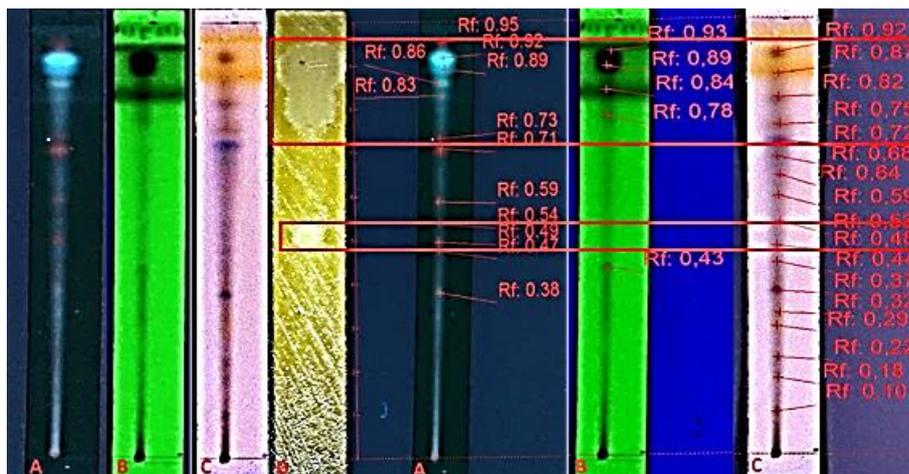


Figura 20: Bioautografia da fase  $\text{CHCl}_3$  de folhas de *A. panurensis* eluída duas vezes em DCM:MeOH (9:1) frente à *Staph. simulans* A= UV 365 nm; B= UV 254 nm; C= revelador vanilina sulfúrica; D= teste de bioautografia.

A fase hexânica de galhos, eluída em Hex:AcOEt (3:7) por duas vezes, exibiu halos entre os Rfs 0,21 e 0,57. Os halos maiores ocorreram principalmente entre os Rfs 0,43 e 0,53, que compreendem as duas manchas majoritárias azuis em UV 365 nm, as quais também se mostraram como as bandas mais visíveis em UV 254 nm (Figura 21).

A fase  $\text{CHCl}_3$  de galhos, eluída em Hex:AcOEt (3:7) por duas vezes, apresentou halos maiores entre os Rfs 0,53 e 0,76, e com pequena inibição na área que compreende os Rfs 0,32 a 0,51 (Figura 22). A área da placa de CCD que apresentou atividade possui duas manchas de maior absorção nos reveladores utilizados, cujas cores são amarelas no revelador vanilina sulfúrica, além de serem visíveis em UV 365 nm e UV 254 nm. Além disso, manchas com menor absorção, logo abaixo, nos Rfs 0,6 e 0,53 em UV 365 nm e 254 nm, apresentaram halos com tamanho semelhante aos compostos majoritários.

Assim como na fase  $\text{CHCl}_3$  de folhas, foi realizada eluição para a identificação de atividade antibacteriana de substâncias mais polares na fase  $\text{CHCl}_3$  de galhos de *A. panurensis*. Esta fração foi eluída em  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9,5:0,5), onde foram observados halos entre os Rfs 0,35 a 0,77 e a presença de inibição antimicrobiana na região de bandas mais polares, especialmente na região do Rf 0,41 (Figura 23).

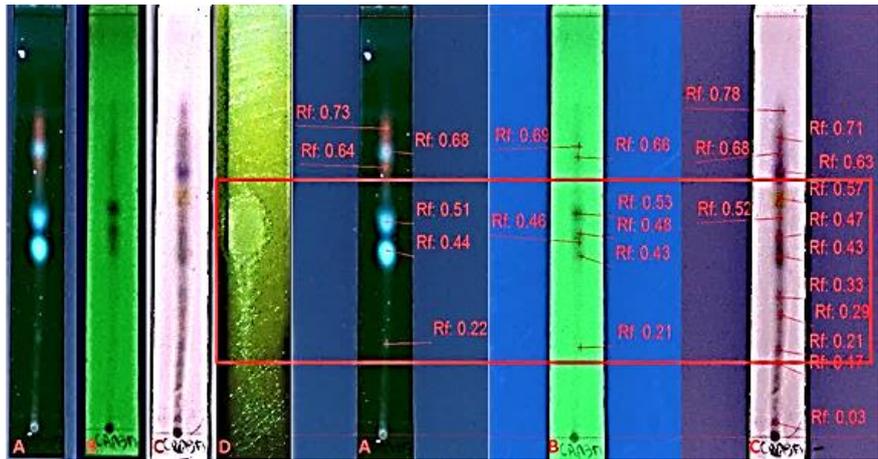


Figura 21: Bioautografia da fase hexânica de galhos de *A. panurensis* eluída duas vezes em Hex:AcOEt (3:7) frente à MRSA. A= UV 365 nm; B= UV 254 nm; C= revelador vanilina sulfúrica; D= teste de bioautografia.

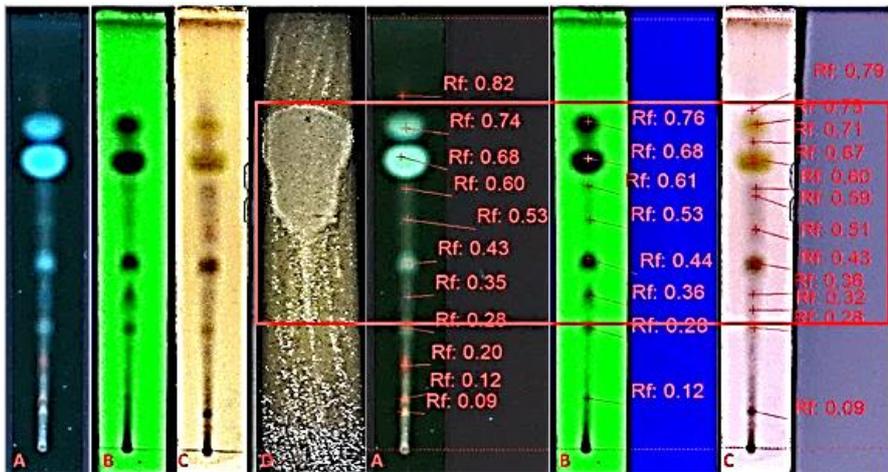


Figura 22: Bioautografia da fase  $\text{CHCl}_3$  de galhos de *A. panurensis* eluída duas vezes em Hex:AcOEt (3:7) frente à MRSA. A= UV 365 nm; B= UV 254 nm; C= revelador vanilina sulfúrica; D= teste de bioautografia.

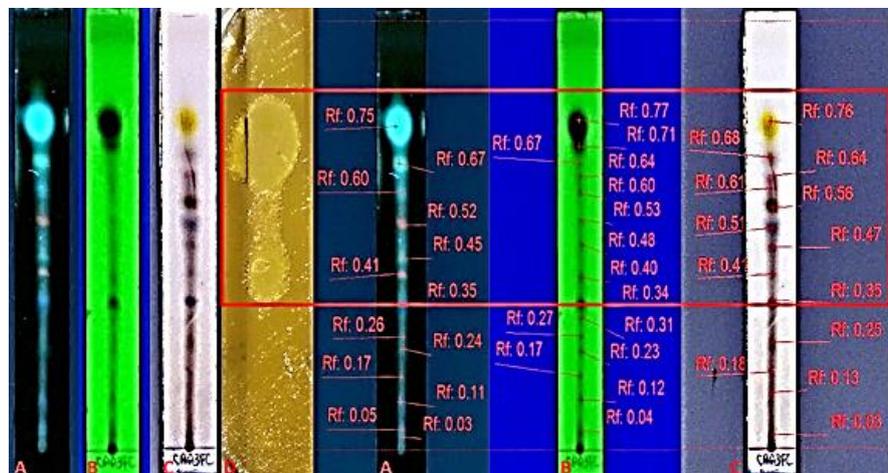


Figura 23: Bioautografia da fase  $\text{CHCl}_3$  de galhos de *A. panurensis* eluída em  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9,5:0,5) frente à MRSA. A= UV 365 nm; B= UV 254 nm; C= revelador vanilina sulfúrica; D= teste de bioautografia.

Em trabalhos bioguiados, as metodologias comumente utilizadas em bioensaios, como difusão em ágar em disco ou poço, ou microdiluição em caldo, avaliam todas as frações obtidas em um fracionamento químico, utilizando um maior número de materiais e levando um tempo relativamente maior para a execução. A técnica da bioautografia apresenta um bom custo-benefício quando comparada às outras técnicas, direcionando o estudo não só para as frações de interesse, como também para as substâncias destas frações que possuem a bioatividade. Isso é possível pela caracterização dessas substâncias utilizando reveladores químicos nas análises de CCD. A partir dos resultados obtidos neste estudo, utilizando a bioautografia, é possível focar diretamente na purificação destas manchas bioativas, as quais são identificadas nas frações, através dos reveladores químicos, pela cor, pelo Rf, e pela intensidade na absorção.

## **5.4 Isolamento e identificação dos constituintes**

### **5.4.1 Fracionamento químico da fração CHCl<sub>3</sub> de galhos de *A. panurensis***

A partir dos resultados de triagem da atividade biológica de extratos e frações das três espécies, foi observado que *A. panurensis* foi a única espécie a apresentar atividade em todos os testes biológicos. Por conta disso, foi dado prioridade ao fracionamento e isolamento de seus constituintes.

A fase em CHCl<sub>3</sub> de galhos mostrou alta atividade antibacteriana e produziu halos de inibição consideráveis na bioautografia. Com esta fração foi realizada Cromatografia em Coluna Flash utilizando 3,5 g de massa para a obtenção da “farofa”. Utilizou-se uma coluna de 2,0 cm de diâmetro, onde foi inserida a fase estacionária (Sílica Flash® F60 da marca SILICYCLE) empacotada a uma altura de 20 cm. Os eluentes e a corrida cromatográfica foram definidos a partir das análises em CCD. A eluição foi em gradiente, utilizando os solventes CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH, em gradiente crescente de polaridade (Tabela 8). As frações coletadas (100 mL) foram concentradas em evaporador rotativo, e, após a eliminação completa do solvente, foram obtidas suas massas e estas foram analisadas por CCD. Para a observação do perfil químico, as placas foram eluídas em DCM:AcOEt (7:3) e reveladas em UV 254 nm, UV 365 nm, vanilina sulfúrica e Dragendorff, este último sendo indicador de alcaloides (Figura 24).

Tabela 8: Eluentes utilizados no fracionamento químico da fase  $\text{CHCl}_3$  do extrato etanólico de galhos de *A. panurensis*.

Frações	Eluentes
1	$\text{CHCl}_3$ 100%
2	$\text{CHCl}_3$ :AcOEt 97:3
3	$\text{CHCl}_3$ :AcOEt 95:5
4	$\text{CHCl}_3$ :AcOEt 93:7
5	$\text{CHCl}_3$ :AcOEt 90:10
6	$\text{CHCl}_3$ :AcOEt 80:20
7	$\text{CHCl}_3$ :AcOEt 70:30
8	$\text{CHCl}_3$ :AcOEt 60:40
9	$\text{CHCl}_3$ :AcOEt 50:50
10	MeOH 100%

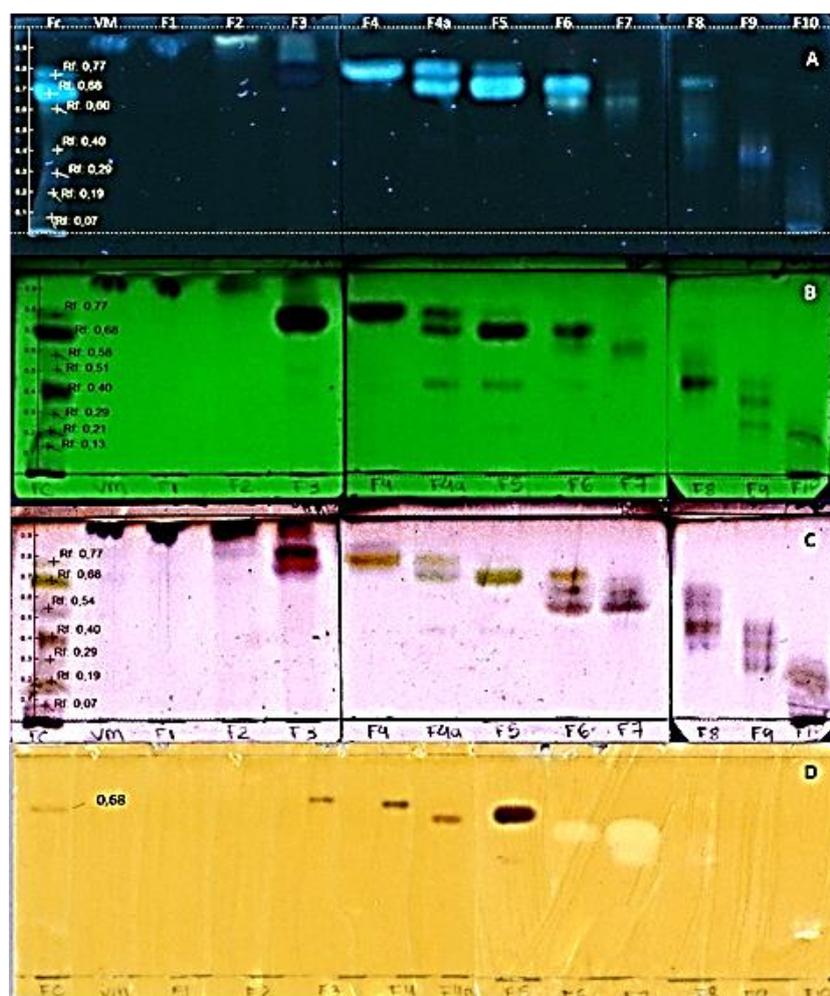


Figura 24: Placas de CCD das frações obtidas em cromatografia em coluna FLASH da fase  $\text{CHCl}_3$  do extrato etanólico de galhos de *A. panurensis* eluídas em DCM:AcOEt (7:3). (A= UV 365 nm; B= UV 254 nm; C= Vanilina sulfúrica; D= Dragendorff)

No teste de bioautografia desta fração, a principal região que exibiu halos de inibição estava na parte mais apolar da placa, que continha substâncias majoritárias com coloração amarela, quando revelados em vanilina sulfúrica, em dois Rfs próximos (Figura 25). Estas substâncias apresentaram-se majoritariamente nas frações F4 a F5 da coluna (Figura 24.C). Além disso, em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa QBioma (BASTOS, 2015; SOUZA, 2014), foi sugerida a atividade antibacteriana desta fração à substância amarela de Rf 0,75 (Figura 25). Por estes motivos, estas frações foram trabalhadas para o isolamento de constituintes.

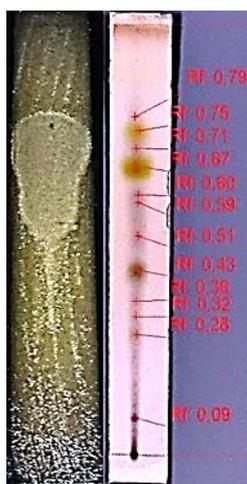


Figura 25: Fase em  $\text{CHCl}_3$  de galhos *A. panurensis* eluída duas vezes em Hex:AcOEt (3:7). A= bioautografia da fração; B= placa revelada em vanilina sulfúrica.

Após os resultados obtidos com as substâncias isoladas das frações F4 e F5, foi realizado teste de bioautografia com as frações da coluna. As frações F6 e F7 foram as únicas que produziram halos de inibição (Figura 26), e com isso se tornaram alvos para o isolamento de constituintes.

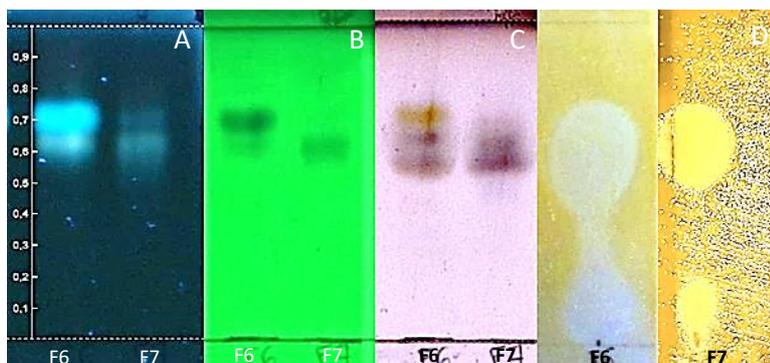


Figura 26: Bioautografia das frações F6 e F7 da coluna cromatográfica de fase em  $\text{CHCl}_3$  de *A. panurensis*. Eluentes: DCM:AcOEt 7:3. A= 365 nm; B= 254 nm; C= Vanilina sulfúrica; D= Teste de bioautografia;

## 5.4.2 Purificação e isolamento de substâncias

### 5.4.2.1 Substância 1

Apesar de não estar entre as frações relacionadas à atividade antibacteriana, na fração 3 da coluna cromatográfica (18 mg) observou-se a formação de um precipitado quando adicionado metanol. A partir de lavagens da fração com metanol, foram obtidos 8,5 mg de um sólido branco (substância 1), que exibiu uma única mancha nas análises de CCD (Figura 27). A amostra, quando analisada por espectrometria de massas no modo positivo, utilizando fonte de ionização APCI, produziu o íon  $m/z$  229. A partir dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HSQC e HMBC, esta substância isolada dos galhos de *A. panurensis* foi confirmada no trabalho de Silva (2018) como 4-metoxi-6-[(*E*)-2-feniletanil]piran-2-ona (4-metoxi-6-*trans*-estiril-pirano-2-ona), mais conhecida como 5,6 dehidrokawaina. Os dados experimentais encontram-se no Anexo 1. Esta molécula é uma estirilpirona já isolada em outras espécies de *Aniba*, como, *A. firmula*, (GOTTLIEB; MORS, 1959), *A. heringerii* (MORS et al., 1962), *A. gardneri* e *A. permollis* (REZENDE et al., 1971).

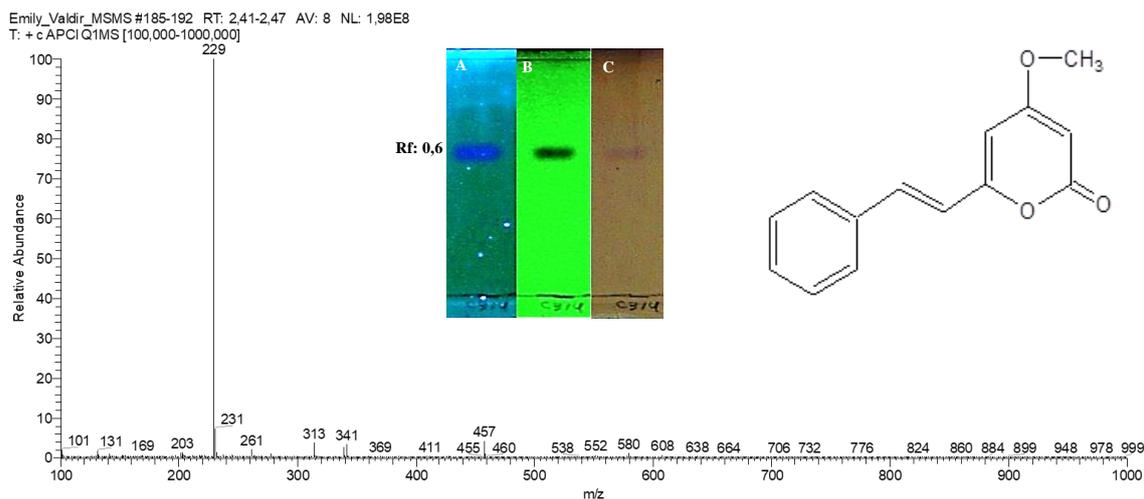


Figura 27: Espectro de massas em fonte APCI modo positivo, placa de CCD (DCM:AcOEt 9:1) e estrutura química da substância 1. Reveladores CCD: A) UV 365 nm; B) UV 254 nm; C) Vanilina sulfúrica.

### 5.4.2.2 Substância 2

A fração F4, que teve 79,4 mg de rendimento, apresentou mancha majoritária amarela em vanilina sulfúrica, e também manchas com coloração preta no revelador Dragendorff, com Rf de 0,77 quando eluída em DCM:AcOEt (7:3) (Figura 24). Esta

fração foi cristalizada e recristalizada em acetona a quente produzindo 33,4 mg de um cristal amarelo (substância 2), que exibiu uma mancha única quando analisado em CCD (Figura 28). Este cristal, quando submetido à análise por espectrometria de massas no modo positivo utilizando fonte de ionização APCI, produziu o íon  $m/z$  273 e com a presença de alguns picos relacionados à fragmentação da molécula, como mostrado no trabalho de Silva (2018), onde foi identificada por dados espectroscópicos e espectrométricos como a estililpirona 4-metoxi-11,12-metilenodioxido-6-*trans*-estirilpirano-2-ona. Dados experimentais do RMN da substância 2 encontram-se no Anexo 2.

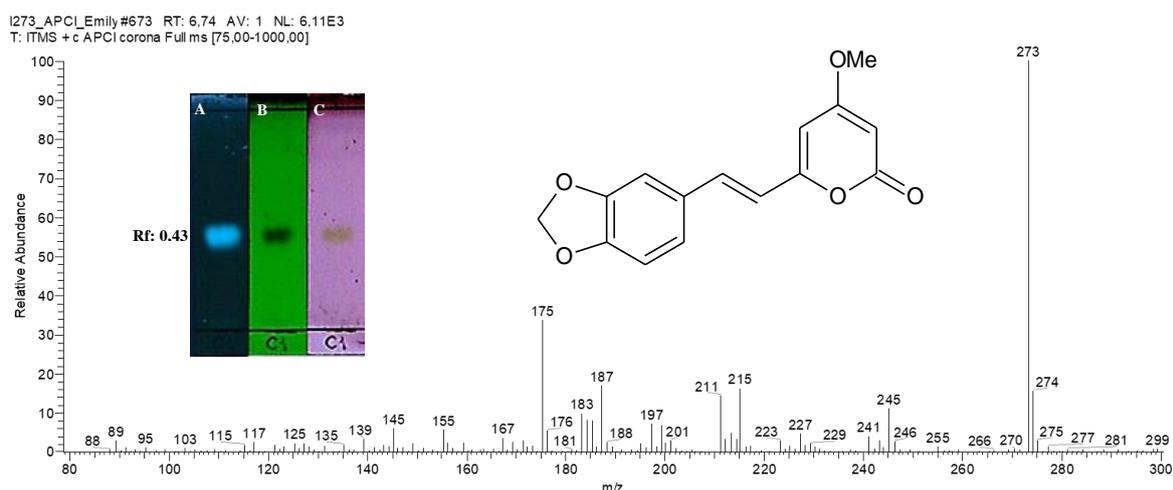


Figura 28: Espectro de massas em fonte APCI modo positivo, placa de CCD (DCM:AcOEt 9,5:0,5) e estrutura química da substância 2. Reveladores CCD: A) UV 365 nm; B) UV 254 nm; C) Vanilina sulfúrica.

### 5.4.2.3 Substância 3

A fração F5, que obteve 278,2 mg de rendimento, também apresenta mancha majoritária amarela em vanilina sulfúrica, porém no  $R_f$  0,68 em DCM:AcOEt (7:3) (Figura 24). Após análises de CCD, 109 mg desta fração foram submetidos a um novo fracionamento com cromatografia em coluna Flash, em coluna de 1,0 cm de diâmetro e com altura da fase estacionária de 22,0 cm, utilizando os solventes  $\text{CHCl}_3$ :AcOEt em gradiente crescente de polaridade (Tabela 9).

Tabela 9: Eluentes utilizados no fracionamento químico da fração F5 da fase em CHCl<sub>3</sub> do extrato etanólico de galhos de *A. panurensis*.

Frações	Eluentes
F5.1	CHCl <sub>3</sub> 100%
F5.2	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 97:3
F5.3	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 95:5
F5.4	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 93:7
F5.5	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 90:10
F5.6	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 85:15
F5.7	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 80:20
F5.8	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 50:50
F5.9	AcOEt 100%

Das 9 subfrações obtidas (Figura 29), as subfrações F5.7 (11,2 mg) e F5.8 (44,4 mg) foram reunidas e cristalizadas e recristalizadas em metanol a quente, produzindo 28,1 mg de um cristal branco (substância 3).

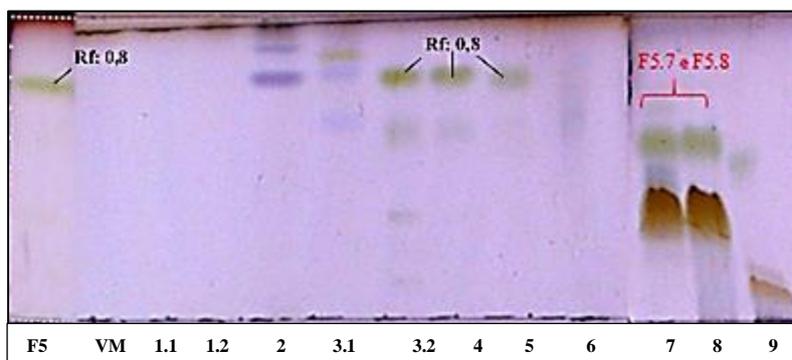


Figura 29: CCD das subfrações (F5.1 a F5.9) obtidas em cromatografia em coluna Flash da fração F5 da fase em CHCl<sub>3</sub> de galhos de *A. panurensis*. Eluentes: DCM:AcOEt 9:1 por duas vezes; Revelador: vanilina sulfúrica.

Após análises de RMN (Anexo 3), esta molécula foi identificada no trabalho de Silva (2018) como a estirilpirona 6,6'-(2,4-Bis(3,4-dimetoxifenil)ciclobutano-1,3-diil)bis(4-metoxi-2H-piran-2-ona) ou rel-(6R, 7S, 8S, 5'S)-4'-metoxi-8-(11, 12-dimetoxifenil-7-[6-(4 metoxi-2-piranil]-6-(E)-estiril- 1'-oxabicyclo [4,2,0] octa-4'-en-2'-ono, que possui massa molecular de 576 g/mol (Figura 30).

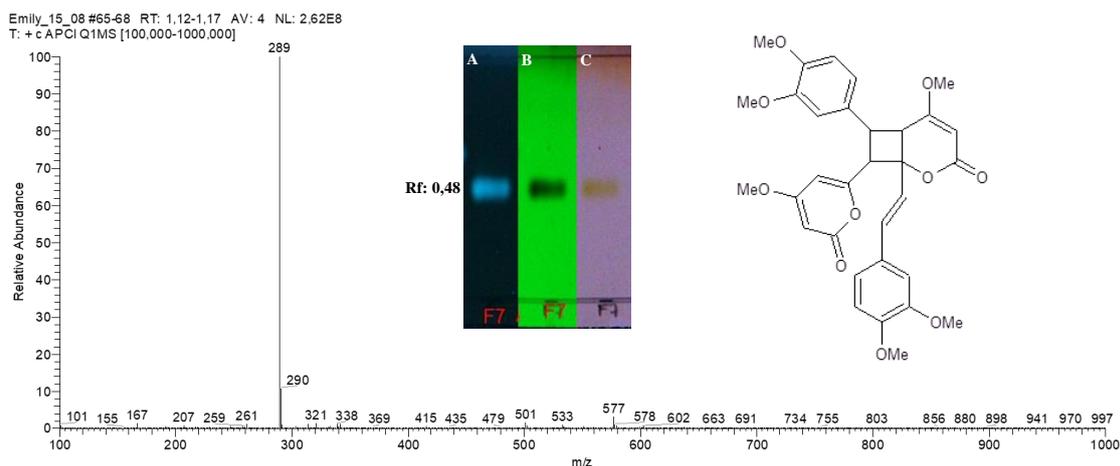


Figura 30: Espectro de massas em fonte APCI modo positivo, placa de CCD (DCM:AcOEt 1:9) e estrutura química da substância 3. Reveladores CCD: A) UV 365 nm; B) UV 254 nm; C) Vanilina sulfúrica.

Quando comparada com a literatura esta molécula foi associada a um dímero de uma estilpirona já isolada na espécie *Aniba* sp., a aniba-dímero A (ROSSI; YOSHIDA; MAIA, 1997). Importante destacar que este cristal, quando analisado no modo positivo em fonte APCI detectou majoritariamente o íon de  $m/z$  289, que corresponde ao monômero da molécula.

Não foi possível obter a substância de cor amarelada em vanilina sulfúrica, em Rf 0,8 (Figura 25), na forma pura, que era o principal alvo de isolamento desta fração.

#### 5.4.2.4 Substância 4

Como dito anteriormente, substâncias que produziram halos de inibição estavam presentes nas frações F6 e F7. A fração F7 obteve 361,2 mg de rendimento e por estar relativamente mais pura, com relação à fração F6, foi trabalhada para o isolamento desta substância.

Foi realizada uma cromatografia em coluna Flash de F7 (C1F7) utilizando os solventes Hex:AcOEt em gradiente crescente de polaridade (Tabela 10), em coluna de 1,5 cm de diâmetro e fase estacionária de 20 cm de altura. Foram coletadas 15 subfrações (80 mL) (Figura 31). A fração C1F7.6 (Hex:AcOEt 6:4), apresentou-se majoritariamente frente às outras, com 239,4 mg de rendimento, e com atividade na bioautografia (Figura 32). Portanto, foi feita uma nova coluna com esta subfração.

Tabela 10: Eluentes utilizados no fracionamento químico da fração F7 da fase em CHCl<sub>3</sub> do extrato etanólico de galhos de *A. panurensis* - C1F7.

Frações	Eluentes	Frações	Eluentes
C1F7.1	Hex 100%	C1F7.9	Hex:AcOEt 45:55
C1F7.2	Hex:AcOEt 90:10	C1F7.10	Hex:AcOEt 40:60
C1F7.3	Hex:AcOEt 80:20	C1F7.11	Hex:AcOEt 35:65
C1F7.4	Hex :AcOEt 70:30	C1F7.12	Hex:AcOEt 30:70
C1F7.5	Hex:AcOEt 65:35	C1F7.13	Hex:AcOEt 25:75
C1F7.6	Hex:AcOEt 60:40	C1F7.14	Hex:AcOEt 20:80
C1F7.7	Hex:AcOEt 55:45	C1F7.15	AcOEt 100%
C1F7.8	Hex:AcOEt 50:50		

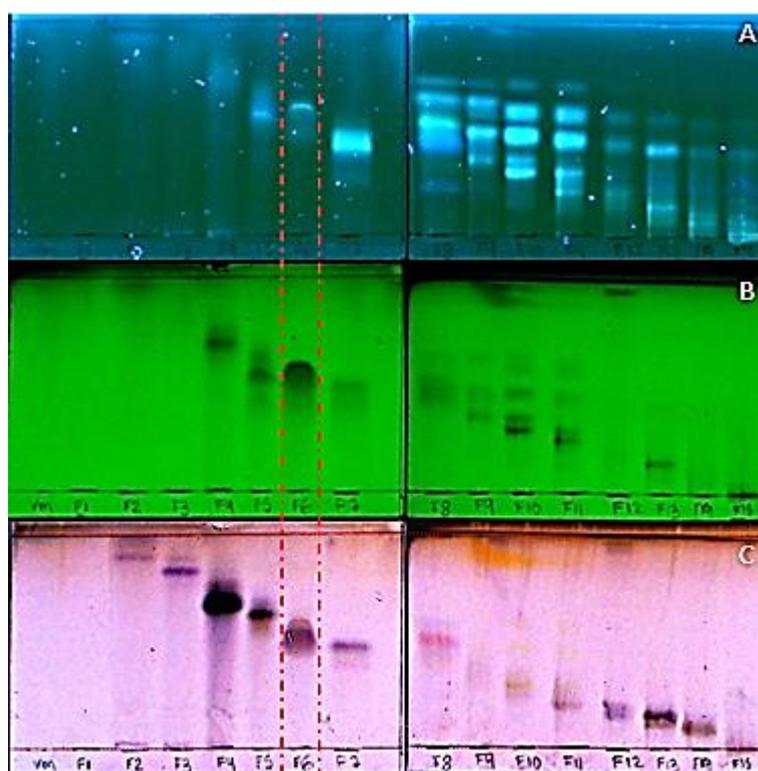


Figura 31: CCD em Hex:AcOEt (1:1) das subfrações obtidas em cromatografia em coluna Flash da fração F7 da fase em CHCl<sub>3</sub> de galhos de *A. panurensis* (C1F7), com C1F7.6 destacada em tracejado vermelho. A) 365nm; B) 254nm; C) Vanilina sulfúrica.



Figura 32: Bioautografia de C1F7.6 eluída em DCM:AcOEt (7:3) contra MRSA.

A fim de purificar a fração C1F7.6, esta foi submetida a uma nova coluna cromatográfica (C2F7), com 1,5 cm de diâmetro e 20 cm de altura, utilizando os eluentes  $\text{CHCl}_3$ :AcOEt em gradiente crescente de polaridade (Tabela 11). Foram coletadas 11 subfrações (80 mL), das quais C2F7.3 (15 mg), C2F7.4 (172 mg) e C2F7.5 (37,9 mg) apresentaram as manchas de interesse (Figura 33). Porém, devido ao maior grau de pureza e mesmo perfil químico, segundo os reveladores, foi dada a continuação da purificação a partir das subfrações C2F7.4 e C2F7.5.

Tabela 11: Eluentes utilizados no fracionamento químico de C2F7.

Frações	Eluentes	Frações	Eluentes
C2.F7.1	$\text{CHCl}_3$ 100%	C2F7.7	$\text{CHCl}_3$ :AcOEt 65:35
C2F7.2	$\text{CHCl}_3$ :AcOEt 90:10	C2F7.8	$\text{CHCl}_3$ :AcOEt 60:40
C2F7.3	$\text{CHCl}_3$ :AcOEt 85:15	C2F7.9	Hex:AcOEt 55:45
C2F7.4	$\text{CHCl}_3$ :AcOEt 80:20	C2F7.10	Hex:AcOEt 50:50
C2F7.5	$\text{CHCl}_3$ :AcOEt 75:25	C2F7.11	AcOEt 100%
C2F7.6	$\text{CHCl}_3$ :AcOEt 70:30		

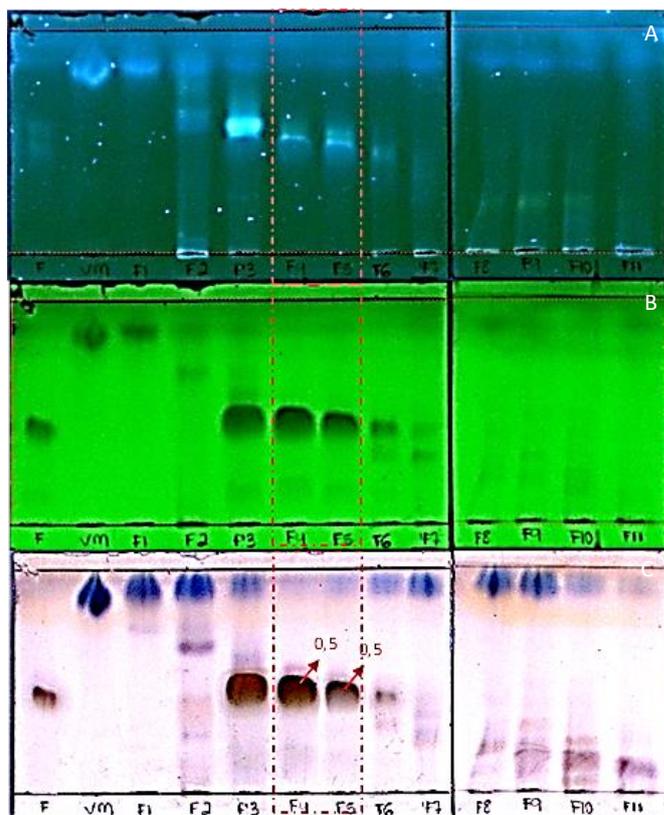


Figura 33: CCD em Hex:AcOEt (1:1) das subfrações obtidas em coluna cromatográfica Flash de C2F7, com C2F7.4 e C2F7.5 destacadas em tracejado vermelho. A) 365nm; B) 254nm; C) Vanilina sulfúrica.

A partir de análises de CCD das subfrações C2F7.4 e C2F7.5, eluindo as placas em DCM:AcOEt 9:1 por duas vezes, foi possível observar a presença de mais substâncias e em Rfs muito próximos (Figura 34). Estas subfrações foram então reunidas e 104 mg foram submetidos a coluna cromatográfica Flash (C3F7), de 1,0 cm de diâmetro e 20 cm de altura, que tinha como fase móvel os eluentes DCM:AcOEt, iniciando em 100:0 e aumentando lentamente a polaridade, até que o gradiente chegasse a 94:6 (Tabela 12).

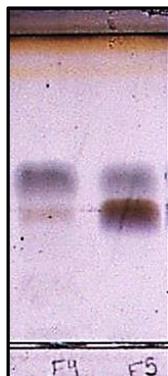


Figura 34: CCD das subfrações C2F7.4 e C2F7.5 eluídas em DCM:AcOEt 9:1 por duas vezes. Revelador: Vanilina sulfúrica.

Tabela 12: Eluentes utilizados no fracionamento químico de C3F7.

Frações	Eluentes	Frações	Eluentes
C3F7.1	DCM 100%	C3F7.9	DCM:AcOEt 97:3
C3F7.2	DCM:AcOEt 99,5:0,5	C3F7.10	DCM:AcOEt 96,5:3,5
C3F7.3	DCM:AcOEt 99:1	C3F7.11	DCM:AcOEt 96:4
C3F7.4	DCM:AcOEt 98,5:1,5	C3F7.12	DCM:AcOEt 95,5:4,5
C3F7.5	DCM:AcOEt 98:2	C3F7.13	DCM:AcOEt 95:5
C3F7.6	DCM:AcOEt 97:2,5	C3F7.14	DCM:AcOEt 95:5
C3F7.7	DCM:AcOEt 97:2,5	C3F7.15	DCM:AcOEt 94:6
C3F7.8	DCM:AcOEt 97:2,5	C3F7.16	AcOEt 100%

Foram coletadas 16 subfrações (20mL), que foram reunidas de acordo com o perfil químico (Figura 35). A bioautografia das subfrações reunidas C3F7.5 + C3F7.6 + C3F7.7 (28,7 mg) relacionou a atividade antibacteriana com a substância com coloração preta no revelador vanilina sulfúrica. A reunião das subfrações C3F7.8+C3F7.9 (18,2 mg) apresentou halos menores na bioautografia, provavelmente por ainda conter resquícios da substância antibacteriana nessas frações, como pôde ser observado através dos reveladores utilizados (Figura 36).

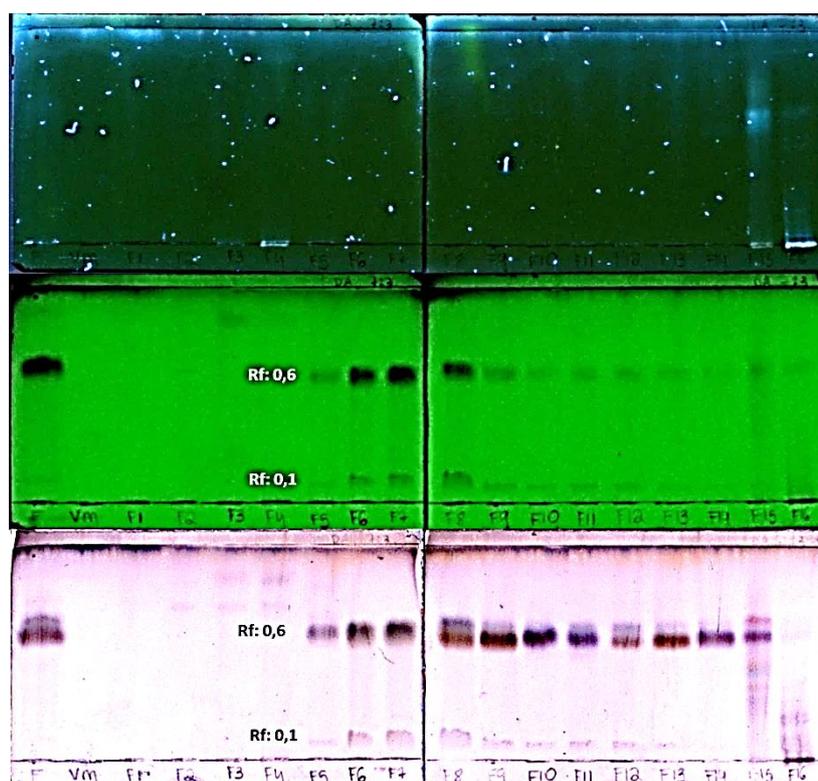


Figura 35: CCD em DCM:AcOEt (7:3) das subfrações obtidas em coluna cromatográfica Flash de C3F7. A) 365nm; B) 254nm; C) Vanilina sulfúrica.



Figura 36: Bioautografia de subfrações reunidas de C3F7. A: C3F7.5 + C3F7.6 + C3F7.7; B: C3F7.8+C3F7.9

As subfrações C3F7.5+C3F7.6+C3F7.7 apresentaram duas manchas nos reveladores 254nm e vanilina sulfúrica e ambas produziram halos de inibição. A fim de investigar a relação das substâncias, as frações reunidas foram submetidas a extração por CCD. Foram aplicados 5 mg da amostra em placa de CCD, que foi eluída em Hex:AcOEt 3:7 e, posteriormente, as regiões nos Rfs correspondentes às duas manchas foram raspadas e extraídas em CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1). Foi observado que a substância do Rf 0,6, quando analisada por CCD, continuou a produzir as duas manchas, como na fração anterior. A mancha do Rf 0,2 exibiu absorção imperceptível (Figura 37).

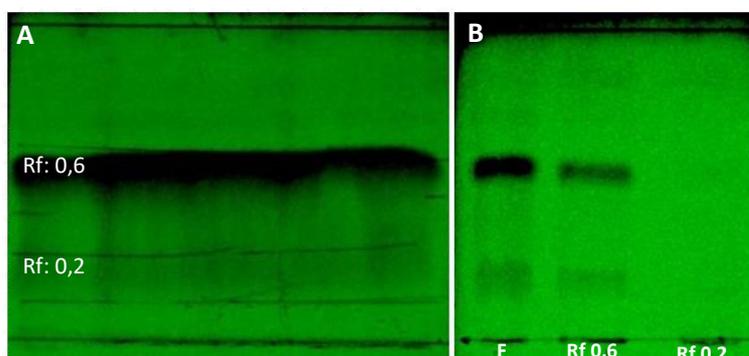


Figura 37: CCD das subfrações reunidas C3F7.5+C3F7.6+C3F7.7 em Hex:AcOEt 3:7. A= CCD da amostra; B= CCD das regiões extraídas com CHCl<sub>3</sub>:MeOH 9:1.

Após estes resultados, as subfrações reunidas C3F7.5+C3F7.6+C3F7.7 foram designadas como a substância 4 e foram submetidas a análises espectroscópicas e espectrométricas para a elucidação química. Os espectros de RMNs de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC e

HMBC podem ser observados no Anexo 4. Os dados experimentais de RMN podem ser observados na Tabela 13.

Tabela 13: Dados dos deslocamentos químicos experimentais da substância 4.

Substância 4				
Posição do C	HSQC		HMBC	
	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm); multiplicidade; J (Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
<b>C</b>				
1	174.00	-	2H-2	
18	176.42	-	H-5	2H-4-
<b>CH</b>				
3	75.98	4.88 (qui, 6.9)	2H-2	
5	33.81	2.34 (t, 7.5)		
<b>CH<sub>2</sub></b>				
2	39.68	2.86 (dd, 16.5, 6.5) 2.69 (dd, 16.5, 6.3)		
4	26.97	2.49 (m), 1.89 (m)	H-5	
6	24.69	1.64 (qui, 7.1)	2H-7	
7	28.46	2.60-2.50 (m)		H-5
8-14	29.71, 29.59, 29.42, 29.38, 29.32, 29.24, 29.06	1.36 a .24 (m)		
15	31.90	1.36-1.24 (m)	2H-16	3H-17
16	22.68	1.36-1.24 (m)	3H-17	
<b>CH<sub>3</sub></b>				
17	14.11	0.88 (t, 6.5)		

No espectro de RMN  $^1H$  da amostra foi possível observar um sinal de tripleto com  $\delta$  0,88, característico de metila, o que foi confirmado pelas análises de RMN  $^{13}C$ , HSQC e DEPT 135. A partir das análises de DEPT 135 e HSQC foi possível observar a presença de diversos H pertencentes a metilenos. O sinal de multiplete aparece na faixa de 4,88 ppm. O grande deslocamento químico de H nessa faixa deve-se ao efeito de desblindagem do átomo de oxigênio eletronegativo ligado ao mesmo C. Isto é confirmado pelas análises de HSQC, onde este sinal acopla com o C  $\delta$ 75,98, que possui sinal positivo no DEPT 135 e está em faixa característica de C ligado a um oxigênio. O 1H-1H-COSY revelou claramente a interação do H-3 ( $\delta$  H 4.88) com os 2H-2 ( $\delta$  H 2.86 e 2.69). Outras interações podem ser observadas na Tabela 13. Ainda, no RMN de  $^{13}C$  é possível observar sinais de C na faixa de  $\delta$  174-176,4 que estão ausentes no DEPT, indicando C pertencente ao grupo carbonila (PAVIA et al., 2010). No espectro de massa *full scan* na fonte APCI, modo positivo, foi observado o íon majoritário  $m/z$  311 (Figura 38).

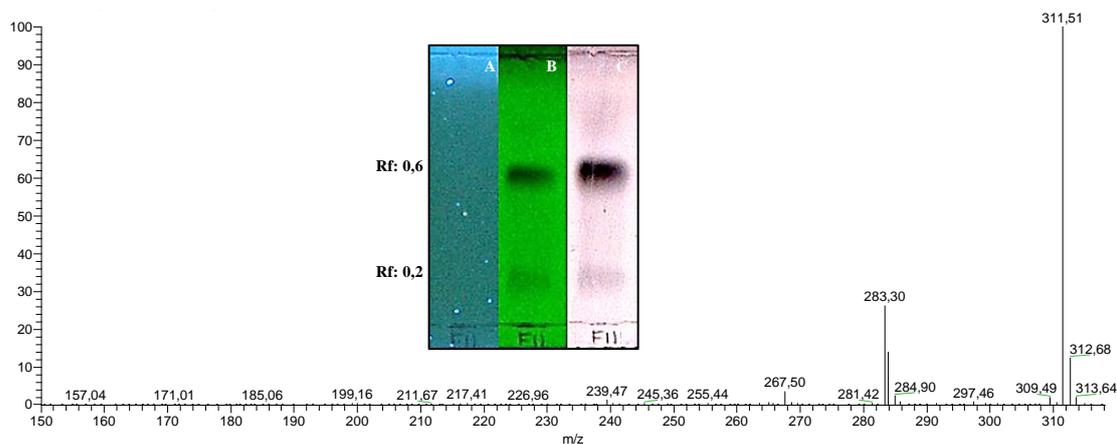


Figura 38: Espectro de massas *full scan* em fonte APCI, modo positivo, da substância 4 e placa de CCD eluída em Hex:AcOEt (3:7). A= 365nm; B= 254nm; C= Vanilina sulfúrica.

A partir dos resultados obtidos por RMN 1D e 2D e espectrometria de massas, a estrutura da substância 4 foi sugerida como 2-Ácido Furanacético, 4-dodeciltetrahydro-5-oxo-, possuindo em sua estrutura uma lactona (furanona), que são definidas como ésteres cíclicos derivada de ácido graxo e uma extremidade de ácido acético (Figura 39).

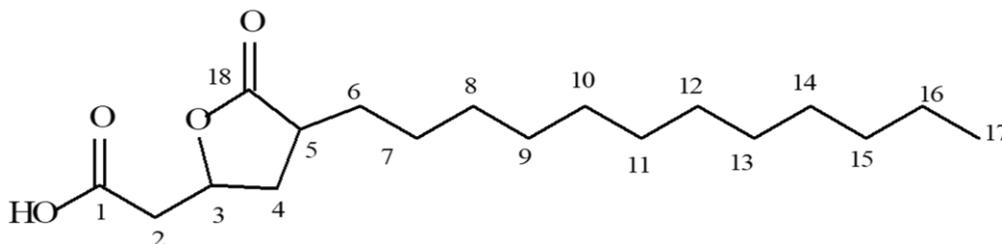


Figura 39: Estrutura química da substância da substância 4.

Diversos trabalhos de plantas do gênero *Aniba* identificaram ésteres na sua composição química (BARBOSA-FILHO et al., 1987; MARCANO-PACHECO et al., 2016; ROSSI; YOSHIDA; MAIA, 1997), porém o presente estudo pode ter isolado uma substância inédita no gênero.

## 5.5 Testes Biológicos das substâncias isoladas

Para avaliar o potencial antimicrobiano das substâncias obtidas de *A. panurensis*, estas foram avaliadas frente a uma ampla gama de micro-organismos. Além da atividade

antibacteriana, também foram avaliadas atividades antifúngica, anti-*Plasmodium*, anti-*Leishmania* e anti-*T.cruzi*.

### 5.5.1 Atividade antibacteriana

#### 5.5.1.1 Determinação da CIM e CBM

Das quatro substâncias avaliadas contra as bactérias, apenas a substância 4 apresentou atividade antibacteriana, contra *B. subtilis*, *Strept. mutans*, *Staph. simulans*, *Staph. aureus* e MRSA, as quais foram suscetíveis à fração de origem, a fração CHCl<sub>3</sub> de galhos de *A. panurensis*. Os valores de CIM e CBM podem ser observados na Tabela 14.

Tabela 14: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da substância 4 (µg/mL) frente às bactérias *B. subtilis*, *Staph. simulans*, *Staph. aureus*, MRSA e *Strep. mutans*.

Amostra	CIM/CBM (µg/mL)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>Staph. simulans</i>	<i>Staph. aureus</i>	MRSA	<i>Strep. mutans</i>
Substância 4	125 / -	7,8 / 31,25	7,8 / 31,25	7,8 / 31,25	31,25 / 31,25
Droga Controle	0,12/0,24	0,06/0,06	0,06/0,12	0,06/0,24	0,06/0,12

Diz-se que a substância é bacteriostática se a razão MBC:MIC  $\geq 4$ , enquanto é dito bactericida quando MBC:MIC  $\leq 2$  (KIPRE et al., 2017). A substância 4 foi bactericida somente frente a *Strep. mutans*, com comportamento bacteriostático contra as demais linhagens.

Apesar das substâncias 2 e 3 estarem em concordância com a região dos Rfs que apresentaram halos nos testes de bioautografia (Figura 40), ambas não apresentaram atividade antibacteriana. Nos trabalhos anteriores de Souza (2014) e Bastos (2015), uma fração, que apresentou majoritariamente a substância 2 deste trabalho, apresentou alta atividade antibacteriana, sendo relacionada a atividade a esta substância. Porém, neste trabalho a substância 2 foi obtida de forma mais pura, na forma de cristal, não exibindo atividade. A atividade da substância 2 nos trabalhos anteriores pode estar relacionada ao sinergismo desta com outras substâncias ainda presentes na amostra.

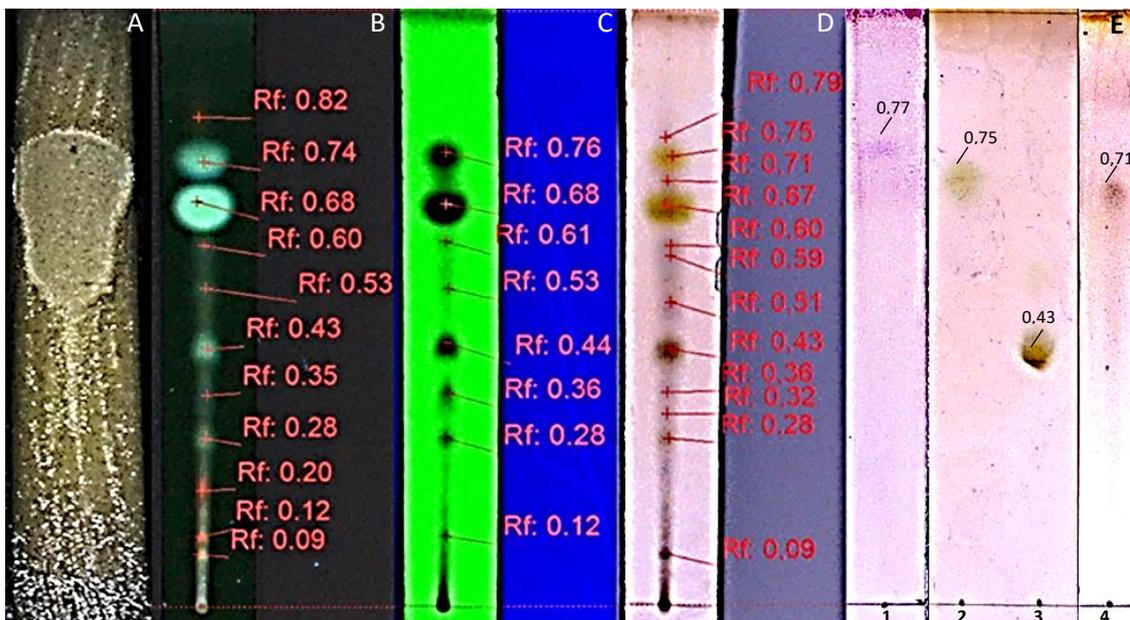


Figura 40: Correlação dos Rfs com bioatividade da fase em  $\text{CHCl}_3$  com os Rfs das substâncias isoladas, ambos eluídos em Hex:AcOEt (3:7). A= Bioautografia da fração em  $\text{CHCl}_3$ ; B= Fração em  $\text{CHCl}_3$  em UV 365 nm; C= Fração em  $\text{CHCl}_3$  em UV 254 nm; D= Fração em  $\text{CHCl}_3$  em Vanilina sulfúrica; E= Substâncias 1, 2, 3 e 4 reveladas em vanilina sulfúrica.

A substância 4, quando eluída em Hex:AcOEt 3:7, possui Rf 0,71, e, no revelador 254 nm, é possível observar uma outra substância no Rf 0,53 (Figura 41). Ambos os Rfs são correspondentes aos halos de inibição da fase em  $\text{CHCl}_3$ . Ainda, as CIMs desta substância foram semelhantes às CIMs obtidas do extrato e fração dos quais foi oriunda. Isso indica que a substância 4 pode ser o principal princípio ativo antibacteriano responsável pela boa atividade tanto da fase  $\text{CHCl}_3$  quanto do extrato de galhos.

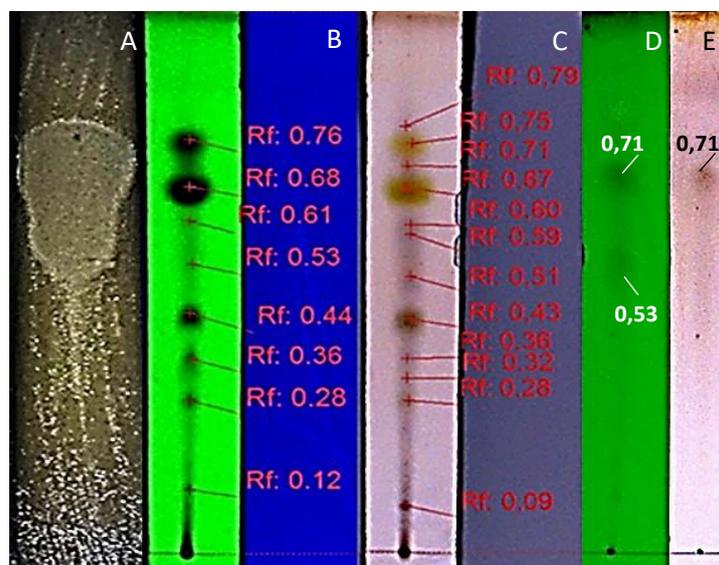


Figura 41: Correlação dos Rfs com bioatividade da fase em  $\text{CHCl}_3$  com os Rfs da substância 4, ambos eluídos em Hex:AcOEt (3:7) por duas vezes. A= Bioautografia da fase em  $\text{CHCl}_3$ ; B= Fase em  $\text{CHCl}_3$  em UV 254 nm; C= Fase em  $\text{CHCl}_3$  em Vanilina sulfúrica; D = Substância 4 revelada em UV 254nm; E= Substância 4 revelada em vanilina sulfúrica.

O resultado obtido pela substância 4, que possui uma furanona em sua estrutura, vai de acordo com diversos estudos que investigaram a atividade antibacteriana de estruturas semelhantes. Barbosa et al. (2010) identificaram a atividade antibacteriana de diversos derivados de furanona contra *B. cereus*, *E. coli* e *Staph. aureus* na concentração de 100 µg/mL. Wu et al. (2004) identificou a atividade antibacteriana de diversos análogos de furanonas contra *P. aeruginosa*. Sharafutdinov et al. (2017) identificaram o efeito antimicrobiano de uma furanona contra biofilmes de *Staph. aureus* e MRSA. Kofie, Fetse e Adosraku (2019), investigando a atividade antibacteriana de vários ésteres, sugeriram ainda que enzimas hidrolíticas podem então hidrolisar o composto para regenerar ácidos, que também podem inibir o crescimento do micro-organismo. A boa atividade exibida pela substância 4 torna a molécula um potencial candidato para estudos futuros de atividade antibacteriana.

A substância antibacteriana que foi isolada neste trabalho teve inibição específica para bactérias gram positivas, incluindo três linhagens estafilocócicas e *Strep. mutans*. Estima-se que linhagens de *Staph. aureus* tenham desenvolvido a capacidade de adquirir resistência a todas as classes de agentes antimicrobianos, sendo um problema significativo para a saúde mundial (KRISHNA et al., 2019) . Atualmente, MRSA é o patógeno mais comum identificado em infecções hospitalares em todo o mundo e está associada ao aumento das taxas de morbidade e mortalidade e aos custos do tratamento (KONG et al., 2018). *Strep. mutans*, por sua vez, é o principal agente etiológico da cárie dentária, na qual os antibióticos utilizados no tratamento têm se tornado cada vez menos eficazes por conta do surgimento de resistência. O uso frequente e excessivo tem levado à resistência além de efeitos colaterais graves (MALYAVANTAM; SHARMA; PRAKASH, 2019). Portanto, a descoberta de novas moléculas antimicrobianas contra bactérias Gram-positivas, especialmente MRSA, é altamente relevante nos dias atuais.

#### **5.5.1.2 Curva de tempo-morte**

Pelo bom potencial antibacteriano exibido pela substância 4, foi realizado teste de curva de morte desta substância contra as bactérias *Staph. aureus*, MRSA e *Strep. mutans*. A atividade antibacteriana em função da dose e do tempo frente às bactérias pode ser observada na Figura 42.

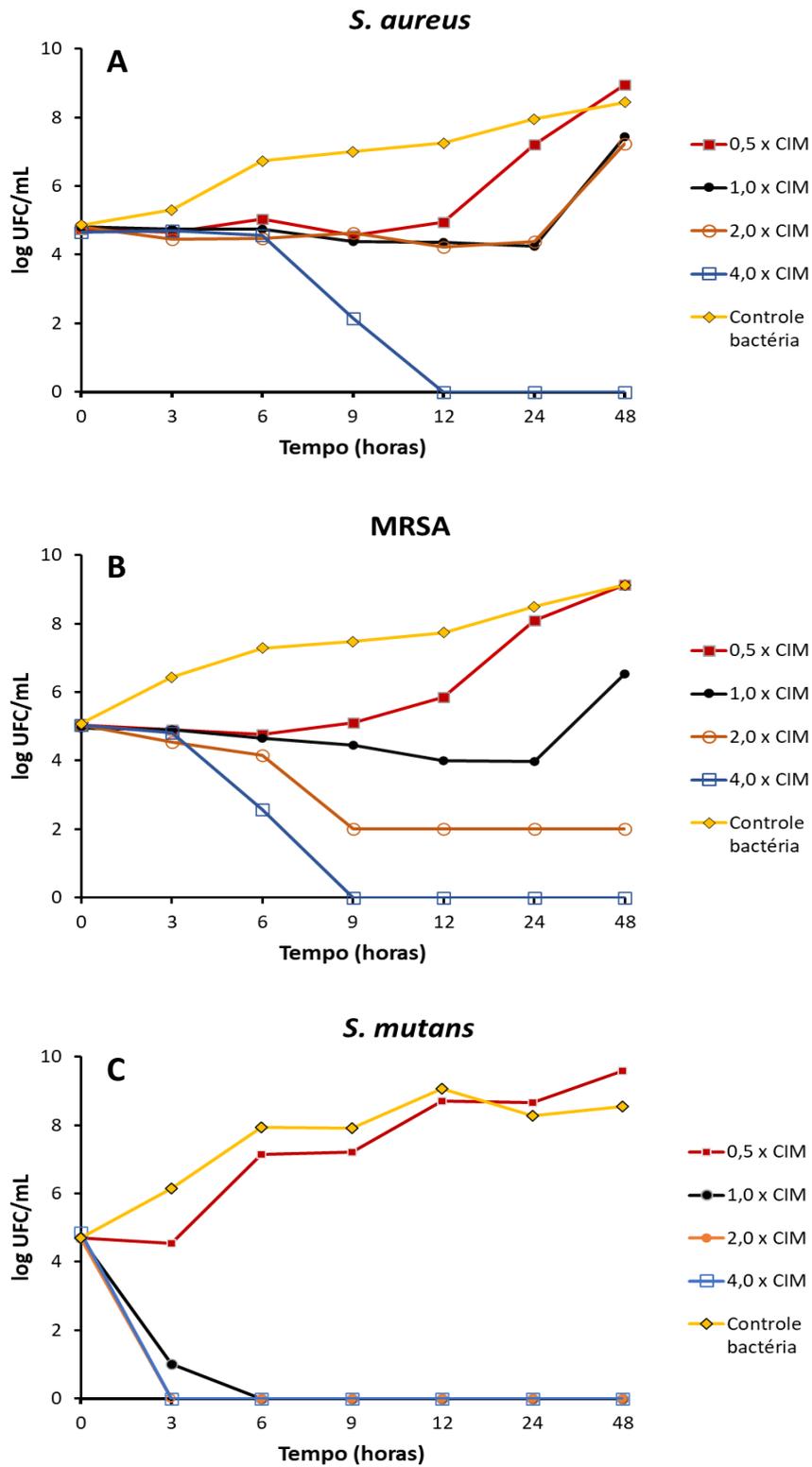


Figura 42: Curva de tempo-morte da substância 4 frente às bactérias *Staph. aureus* (A), MRSA (B) e *Strep. mutans* (C). CIM : Concentração Inibitória Mínima.

A substância antibacteriana apresentou efeito bactericida contra *Staph. aureus* apenas na concentração de 4,0xCIM, conforme já tinha sido exposto pelo teste de CBM, no intervalo de 12 h. A concentração de 1,0xCIM apenas inibiu o crescimento da população bacteriana. O aumento na concentração em 2,0xCIM não exibiu efeito no aumento da atividade. Na subconcentração 0,5xCIM, a inibição do crescimento bacteriano foi mantida até o intervalo de 9 h.

Na curva contra a linhagem MRSA, assim como na curva contra *Staph. aureus*, a substância 4 apenas inibiu o crescimento bacteriano na sua CIM, apresentando redução <1 log de morte bacteriana. A amostra na concentração em 0,5xCIM mostrou atividade bacteriostática até o período de 6 h, após isso perdendo a atividade. O aumento na atividade antibacteriana na concentração de 2,0xCIM foi observado a partir do período de 9 h, com redução > 3 log na população microbiana. No mesmo intervalo de tempo foi observado o efeito bactericida na concentração de 4,0xCIM.

Como pôde ser visto na curva da substância 4 contra *Strep. mutans*, quando a concentração da substância foi de 1,0 x CIM, ela apresentou efeito bactericida por volta das 6 h. A ação bactericida foi obtida mais rapidamente com o aumento da concentração da droga, com as amostras em 2,0xCIM e 4,0xCIM alcançando a morte de todas as bactérias já no primeiro intervalo de tempo analisado. Na concentração 0,5xCIM a atividade foi bacteriostática até o período de 3h.

Estudos de *time-kill* são importantes porque informações abrangentes sobre a farmacodinâmica da atividade antibacteriana da substância podem não ser obtidas através do ensaio de CIM. Este ensaio possibilita a quantificação da diminuição do crescimento bacteriano em função do tempo e da concentração do fármaco (OSUNTOKUN et al., 2019). Os resultados obtidos neste ensaio mostraram que a substância 4 teve a atividade bactericida influenciada pela concentração dela.

### **5.5.1.3 Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Transmissão (MET)**

Com o objetivo de verificar as alterações celulares ocasionadas pela substância isolada nas células microbianas testadas, as células bacterianas tratadas com a substância foram analisadas por MEV e MET.

Nas micrografias foi possível observar que as células não tratadas de *Staph. aureus* exibiram uma aparência de superfície celular lisa, com a parede celular e

membrana intactas (Figura 43.A, 43.B, 43.E). Nas análises de MEV, as células tratadas com a substância antimicrobiana mostraram o aparecimento de estruturas semelhantes a bolhas ou depósitos e uma abundância aumentada de detritos extracelulares (Figuras 43.C e 43.D). Nas micrografias de MET, as bactérias tratadas com o antimicrobiano exibiram membranas citoplasmáticas parcialmente separadas da parede celular, resultando em grandes vacúolos, além de condensação e encolhimento do citoplasma (Figuras 43.F, 43.G, 43.H).

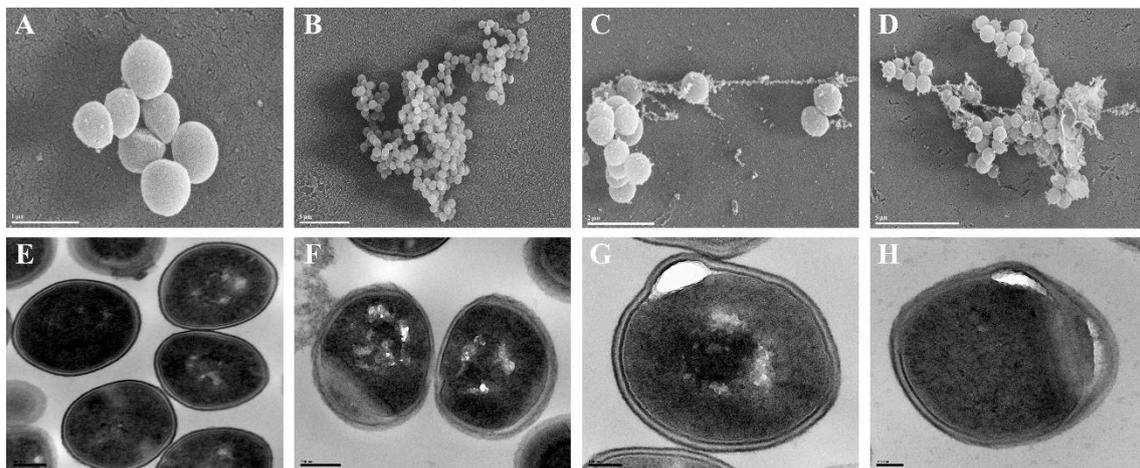


Figure 43: Micrografias de MEV (A,B,C,D) e MET (E,F,G,H) de *Staphylococcus aureus* tratadas com a substância 4 de *Aniba panurensis*. Controle (A,B ,E) e células tratadas com a substância 4 (C,D,F,G,H).  
Bar = 5  $\mu\text{m}$  (B,D), 2  $\mu\text{m}$  (C), 1  $\mu\text{m}$  (A), 200 nm (E,F), 100 nm (G,H).

Na linhagem MRSA (Figura 44), pôde-se observar em MEV que a exposição à substância resultou no rompimento da parede bacteriana, resultando em extravasamento de conteúdo citoplasmático, além de detritos extracelulares em sua superfície (Figuras 44.C e 44.D), enquanto as células não tratadas apresentaram formato liso e redondo (Figuras 44.A e 44.B). As análises de MET mostraram células-controla com paredes celulares lisas e bem definidas (Figura 44.E), enquanto nas células microbianas tratadas foi possível observar deformidades na morfologia celular, com a desintegração da parede celular, possível alvo primário de ação do antimicrobiano, além de extensa lesão à membrana celular (Figuras 44.F, 44.G e 44.H).

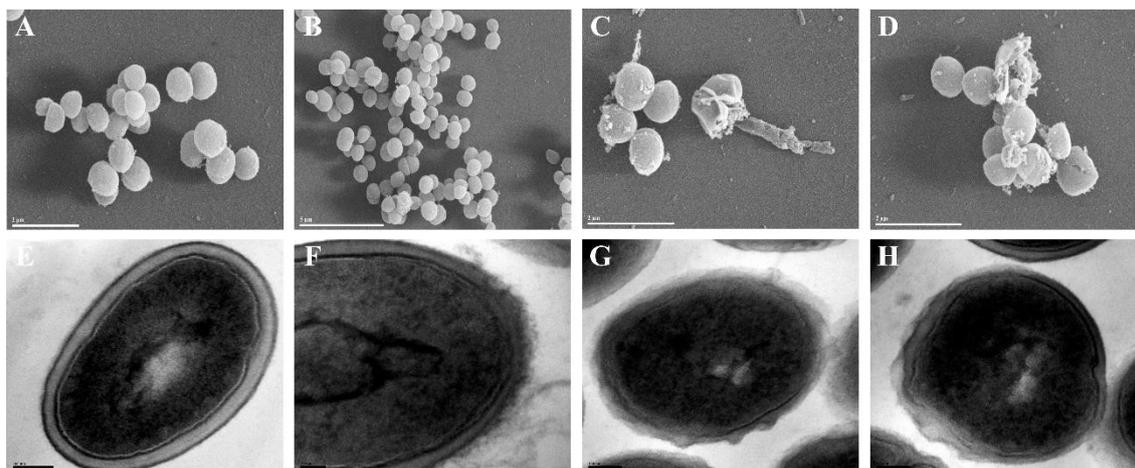


Figure 44: Micrografias de MEV (A,B,C,D) e MET (E,F,G,H) de MRSA tratadas com a substância 4 de *Aniba panurensis*. Controle (A,B,E) e células tratadas com a substância 4 (C,D,F,G,H). Bar = 5  $\mu\text{m}$  (B), 2  $\mu\text{m}$  (A,C,D), 100 nm (E,G,H), 50 nm (F).

As células tratadas de *Strep. mutans* (Figura 45) exibiram várias alterações quando comparadas ao controle. Nas micrografias de MEV, observa-se as células tratadas com superfícies celulares rugosas e enrugadas, células deformadas, aparência encolhida e superfície alterada, além de lise celular e restos de células mortas (Figuras 45.C e 45.D). Nas análises de MET foram observadas, principalmente, separação parcial da parede celular e citoplasma (Figura 45.F), desintegração da parede celular, extravasamento de conteúdo citoplasmático (Figura 45.G) e perda de material celular eletrodensso (Figura 45.H).

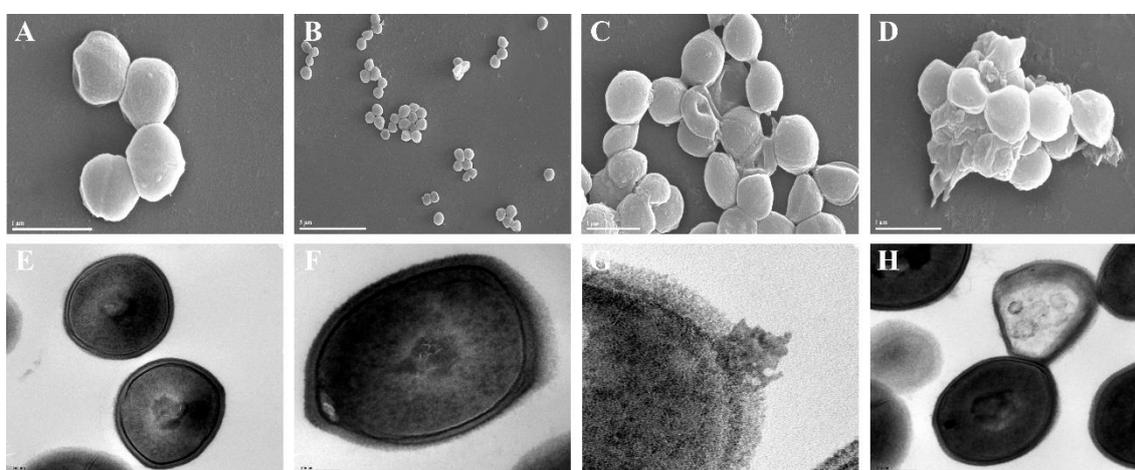


Figure 45: Micrografias de MEV (A,B,C,D) e MET (E,F,G,H) de *Streptococcus mutans* tratadas com a substância 4 de *Aniba panurensis*. Controle (A,B,E) e células tratadas com a substância 4 (C,D,F,G,H). Bar = 5  $\mu\text{m}$  (B), 1  $\mu\text{m}$  (A,C,D), 200 nm (E,H), 100 nm (F), 50 nm (G).

As micrografias de MEV e MET mostraram que a substância atua, principalmente, na separação do citoplasma da parede celular em *Staph. aureus*. Isso deve ocorrer por conta do caráter lipofílico da molécula. *Staph. aureus* foi a única entre as três linhagens estudadas onde não foi observada a ocorrência de lise celular.

Os resultados de MRSA e *Strep. mutans* indicam que a estrutura da parede celular e a membrana plasmática foram afetadas pela substância isolada nestas bactérias, resultando na perda de conteúdo celular. Na linhagem MRSA, ficou evidente a deformação e desintegração da parede celular, e, conseqüentemente, posterior dano à membrana plasmática, com lise celular e extravasamento de conteúdo citoplasmático. O principal mecanismo de antibióticos que atuam na parede celular é a inibição da síntese do peptidoglicano (Silva-Duarte et al., 2019), indicando que a substância isolada possa estar interferindo neste processo. As diferentes alterações observadas em *Strep. mutans* indicam que a substância isolada tem diferentes alvos celulares nesta linhagem. Neste estudo, descobrimos que a substância 4 tem capacidade de deformar tanto as membranas celulares quanto provocar a deformação e ruptura da estrutura da parede celular. Alterações similares foram observadas no tratamento de bactérias *Staph. aureus* com cinamaldeído, um fenilpropanoide, e os mecanismos foram atribuídos à habilidade de hidrocarbonos interagirem com estruturas hidrofóbicas e às suas propriedades lipofílicas (SHEN et al., 2015). Além disso, a atividade antimicrobiana da substância pode ser potencializada pela presença de ácido acético em sua estrutura. Sabe-se que o ácido acético tem sido utilizado há milênios como antisséptico e que estudos relatam sua atividade antibacteriana e antifúngica (RYSSEL et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2018). São necessários estudos adicionais, incluindo análises de MEV e MET desta substância em diferentes concentrações e intervalos de tempo, para a elucidação de todos os mecanismos possíveis de atuação frente às bactérias estudadas.

### **5.5.2 Atividade antifúngica**

As substâncias obtidas da fase  $\text{CHCl}_3$  de galhos de *A. panurensis* também foram testadas contra os fungos dermatófitos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. gypseum*, e também contra a levedura *C. albicans*. As substâncias 1 e 4 exibiram boa atividade contra *T. rubrum*, com CIM de 62,5 e 7,8  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Ambas também exibiram moderada atividade contra *C. albicans* (Tabela 15).

Tabela 15: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) das substâncias dos galhos de *A. panurensis*.

Amostra	CIM/CFM ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>C. albicans</i>
Substância 1	62,5 / 125	-	-	500 / 500
Substância 4	7,8 / 15,6	-	-	125 / 250
Droga Controle	1,9 / 1,9	1,9 / 3,9	15,6 / 15,6	7,8 / 31,25

A classe da substância 1, as estirilpironas, exibiram atividade fungitóxica contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* no trabalho de Telascrea et al. (2005), sendo o aumento da atividade relacionado conforme menor cadeia lateral da molécula. O mesmo foi observado no trabalho de Malebo et al. (2014), com duas estirilpironas exibindo fraca a moderada atividade frente a *C. albicans*. A estirilpirona mais ativa do trabalho de Telascrea et al. (2005), uma estirilpirona já isolada de *A. panurensis*, a goniotalamina, (REZENDE et al., 2015), também obteve bons resultados contra fungos de diversas linhagens de *Candida* (MARTINS et al., 2009). Não foram encontrados na literatura relatos da atividade de estirilpironas contra *T. rubrum*. Considerando os diversos estudos de plantas do gênero *Aniba*, que relataram a produção de estirilpironas, trabalhos bioguiados em plantas do gênero devem ser realizados para a investigação de moléculas que possam ser usadas no desenvolvimento de novos antifúngicos.

No que se refere à estrutura química da substância 4, além do potencial antifúngico do ácido acético já relatado anteriormente (GUIMARÃES et al., 2018), há diversos estudos na literatura investigando o potencial antifúngico de furanonas, estrutura também presente na substância. Pour et al. (2000, 2001, 2003) investigaram a atividade antifúngica de diversos análogos de 3-Phenyl-5-methyl-2H,5H-furan-2-one, com algumas estruturas apresentando CIM de  $\leq 7,8 \mu\text{g/mL}$  contra *Candida* spp. e fungos filamentosos, inclusive *T. mentagrophytes*. Feng et al. (2015) investigou atividade antifúngica de quatro ésteres de ácido graxo contra *T. rubrum*, que mostraram CIMs de  $64 \mu\text{g/mL}$ . Os dados da literatura sugerem a relação da função éster e desse tipo de estrutura de lactona com a atividade antifúngica, instigando estudos de semissíntese com esse tipo de molécula.

*T. rubrum* é o fungo mais frequente em casos clínicos de micoses (PERES et al., 2010), enquanto *C. albicans* é o principal patógeno responsável pelas candidíases, que

em infecções sistêmicas pode levar à morte (MAYER; WILSON; HUBE, 2013). Diversos mecanismos de resistência aos antifúngicos já foram identificados em dermatófitos e especialmente *C.albicans*, que tem chamado a atenção dos profissionais de saúde nos últimos anos (EMAM; EL-SALAM, 2016; OLIVEIRA et al., 2016). Isto torna relevante os resultados obtidos pelas substâncias 1 e 4, no que se refere à busca de novas moléculas na natureza para o desenvolvimento de antifúngicos.

### 5.5.3 Atividade antiparasitária contra *P. falciparum*, *T.cruzi* e *L. amazonensis*

Nos testes antiparasitários, frente aos parasitos *P. falciparum*, *T. cruzi* e *L. amazonensis*, os resultados podem ser observados na Tabela 16.

Na atividade antiplasmódica, a substância 1 apresentou o melhor resultado, com  $CI_{50}$  de 3,2  $\mu\text{g/mL}$  (14  $\mu\text{M}$ ). A substância 2, 3 e 4 apresentaram  $CI_{50}$  de 36,16  $\mu\text{g/mL}$  (132  $\mu\text{M}$ ), 28,32  $\mu\text{g/mL}$  (49  $\mu\text{M}$ ) e 33,2  $\mu\text{g/mL}$  (106  $\mu\text{M}$ ), respectivamente. As substâncias 2, 3 e 4 apresentaram atividade considerada baixa para uma substância pura, segundo dados da literatura e quando comparados à droga controle ( $CI_{50}$  0,43  $\mu\text{M}$ ).

Já no teste antichagásico, apenas a substância 4 exibiu atividade contra *T. cruzi*, com  $CI_{50}$  de 28,9  $\mu\text{g/mL}$  (92  $\mu\text{M}$ ) contra a forma epimastigota e 20,1  $\mu\text{g/mL}$  (64  $\mu\text{M}$ ) contra a forma tripomastigota. Além da baixa atividade, quando considerada a linhagem de célula utilizada para a obtenção da forma intracelular nos ensaios, a célula LLCMK<sub>2</sub>, a substância 4 não apresentou seletividade para o parasito, com  $CC_{50}$  de 66,1  $\mu\text{M}$ . Nenhuma das quatro substâncias analisadas apresentou inibição contra as formas parasitárias de *L. amazonensis* nas concentrações testadas.

Tabela 16: Valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) para as substâncias isoladas de galhos de *A. panurensis* testadas contra *P. falciparum*.

Amostra	$CI_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )		
	Ensaio <i>P. falciparum</i>	Ensaio <i>T. cruzi</i>	
	Esquizonte	Epimastigota	Tripomastigota
Substância 1	14	-	-
Substância 2	>100	-	-
Substância 3	49	-	-
Substância 4	>100	92	64,4
Droga controle	0,43	12,3	10,1

A atividade antimalárica das estirilpironas, classe química da substância 1, tem sido relatada em alguns estudos (ZOHDI et al., 2017; McCracken et al. 2012; LEKPHROM; KANOKMEDHAKUL; KANOKMEDHAKUL, 2009). Os resultados obtidos vão de encontro ao já relatado na literatura no que se refere ao potencial anti-*Plasmodium* de estirilpironas.

Assim como para a atividade antimalárica, as estirilpironas também já foram relatadas possuir propriedades anti-*Trypanosoma* (Bartlett et al., 2013; Yadav et al., 2013). As substâncias 1, 2 e 3 deste trabalho já foram relatadas exibir fraca atividade contra *T. cruzi* e *L. donovani* (McCracken et al., 2012). Apesar dos resultados pouco promissores obtidos no presente estudo, Fernandes (2017) identificou alta atividade de uma fração do extrato etanólico de galhos de *A. panurensis* contra a forma tripomastigota de *T. cruzi*, com  $CI_{50}$  de 5  $\mu\text{g/mL}$ . Um estudo fitoquímico bio guiado da espécie deve ser conduzido para investigar a atividade dos metabólitos secundários desta planta frente a este parasito.

#### **5.5.4 Teste de citotoxicidade frente à linhagem celular VERO**

As plantas sintetizam substâncias tóxicas que as protegem contra insetos, infecções e herbívoros, mas também podem afetar outros organismos, inclusive humanos. Assim, o teste de citotoxicidade é importante para avaliar a segurança das amostras no uso medicinal, a fim de verificar se a concentração necessária para o efeito antimicrobiano causa toxicidade indesejada para células sadias (Abdul et al., 2014). O ensaio de citotoxicidade neste estudo foi conduzido para avaliar a viabilidade das substâncias frente a uma linhagem celular não tumoral.

As substâncias foram avaliadas quanto à sua citotoxicidade frente a células VERO, linhagem celular não tumoral recomendada internacionalmente para testes de citotoxicidade (ISO, 2009). Os resultados da concentração citotóxica das substâncias em 50% das células ( $CC_{50}$ ) podem ser observados na Tabela 17.

Tabela 17: Valores de  $CC_{50}$  das substâncias obtidas de galhos de *A. panurensis* frente à linhagem VERO.

Amostra	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Substância 1	-
Substância 2	-
Substância 3	-
Substância 4	148

(-): não exibiram citotoxicidade

As substâncias 1, 2 e 3 não promoveram morte celular em nenhuma das concentrações testadas. A substância 4, que exibiu alto potencial antibacteriano e antifúngico (CIM 7,8  $\mu\text{g/mL}$ ), obteve  $CC_{50}$  de 148  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados obtidos utilizando esta linhagem celular mostraram que os índices de  $CC_{50}$  das amostras com potencial antimicrobiano são muito superiores às concentrações necessárias para a respectiva atividade antimicrobiana, indicando maior toxicidade para os microorganismos que para células de mamífero e, conseqüentemente, uma viabilidade provável do uso dessas amostras para fins medicinais.

## 6 CONCLUSÕES

- Dentre as três espécies estudadas, a espécie *A. panurensis* exibiu os melhores resultados, revelando-se uma potencial fonte de metabólitos secundários com atividades biológicas e instigando estudos bioguiados da espécie.
- No presente estudo, os metabólitos com potencial antibacteriano e antiplasmódico da espécie *A. panurensis* possuem natureza menos polar, como mostrado pelas fases Hex e  $\text{CHCl}_3$ .
- Os ensaios de bioautografia com bactérias estafilocócicas levaram ao isolamento da substância 4, 2-Ácido Furanacético, 4-dodeciltetrahydro-5-oxo, que obteve as mesmas CIMs da fase e extrato dos quais foi oriunda, reforçando o bom custo-benefício desta metodologia.
- A substância 1 (5,6 dehidrokawaina) exibiu bom potencial antimalárico, enquanto a substância 4 exibiu bom potencial contra bactérias gram positivas de importância clínica, como *Staph. aureus*, MRSA e *Strep. mutans*. Ambas também exibiram potencial antifúngico contra o fungo dermatófito *T. rubrum*.
- A substância 4, na sua CIM, é bacteriostática contra *Staph. aureus* e MRSA, e bactericida contra *Strep. mutans*. A ação bactericida contra *Staph. aureus* e MRSA é dependente da concentração da amostra.
- Em análises de MEV e MET sobre as bactérias *Staph. aureus*, MRSA e *Strep. mutans*, a substância 4 exibiu diferentes modos de ação para cada bactéria analisada. Foi possível observar atuação na separação da parede celular do citoplasma *Staph. aureus*, desintegração da parede celular de MRSA, e diversas alterações em *Strep. mutans*, como membranas citoplasmáticas parcialmente separadas da parede celular, desintegração da estrutura da parede celular e extravasamento de conteúdo celular com perda de material eletrodenso. Mais estudos investigando aspectos mecânicos da substância 4 devem ser realizados para a elucidação de seus mecanismos de ação.

- No teste de citotoxicidade contra células VERO, as substâncias 1 e 4 exibiram seletividade às células microbianas suscetíveis.

- A atividade antimicrobiana exibida pelas substâncias 1 e 4 fornecem importantes informações para estudos futuros que abordem o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas antimicrobianas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL, L.; HAITHAM, M.A.; MOAWIA, E.H.; SAUD, A.R.A.; FAHAD, N.A. Medicinal plants from Saudi Arabia and Indonesia: In vitro cytotoxicity evaluation on Vero and Hep-2 cells. **Journal of Medicine Plant Research**, vol. 8, n.34, p. 1065-1073. 2014.
- ABU, N.; AKHTAR, M. N.; YEAP, S. K.; LIM, K. L.; HO, W. Y.; ZULFADLI, A. J.; OMAR, A. R.; SULAIMAN, M. R.; ABDULLAH, M. P.; ALITHEEN, N. B. Flavokawain A Induces Apoptosis in MCF-7 and MDA-MB231 and Inhibits the Metastatic Process In Vitro. **PLOS ONE**, vol. 9, n. 10, p. e105244. 2014.
- ACOSTA, R. G.; VARGAS, C. M. Mecanismos de resistência bacterianos. **Diagnóstico**, vol. 57, n. 2, p. 82-86. 2018.
- ADESOKAN, A.A.; AKANJI, M.A.; YAKUBU, M.T. Antibacterial potentials of aqueous extract of *Enantia chlorantha* stem bark. **African Journal of Biotechnology**, vol. 6, n. 22, p. 2502-2505. 2007.
- AISHWARYA; GOEL, A.; NIJHAWAN, R. A Deep Learning Approach for Classification of Onychomycosis Nail Disease. In: SINGH, P.; PANIGRAHI, B.; SURYADEVARA, N.; SHARMA, S.; SINGH, A. (eds) *Proceedings of ICETIT 2019. Lecture Notes in Electrical Engineering*. Springer:Cham, 2020. p. 1112-1118.
- ALCÂNTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. K. L.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; LIMA, E. S. Composição química de óleos essenciais de espécies de *Aniba* e *Licaria* e suas atividades antioxidante e antiagregante plaquetária. **Química Nova**, vol. 33, n.1, p. 141-145. 2010.
- ALCOBA, A. E. T.; MELO, D. C.; ANDRADE, P. M.; DIAS, H. J.; PAGOTTI, M. C.; MAGALHÃES, L. G.; JÚNIOR, W. G. F.; CROTTI, A. E. M.; MIRANDA, M. L. D. Chemical composition and in vitro antileishmanial and cytotoxic activities of the essential oils of *Ocotea dispersa* (Nees) Mez and *Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer (Lauraceae). **Natural Product Research**, vol. 31, n.23, p. 1-4. 2017.
- ALIPOUR, M.; MOZAFARI, N. A. Terbinafine susceptibility and genotypic heterogeneity in clinical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* by random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Journal of Mycologie Medicale**, vol. 25, n. 1, p. e1-9. 2015.
- ALLELUIA, I. B.; BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, V. A. G.; MARQUES, R. (-) Rubranine from *Aniba Rosaedora*. **Phytochemistry**, vol. 17, n. 1, p. 517-521. 1978.
- ALONZO, F.; KOZHAYA, L.; RAWLINGS, S. A.; REYES-ROBLES, T.; DUMONT, A. L.; MYSZKA, D. G.; LANDAU, N.; UNUTMAZ, D.; TORRES, V. J. CCR5 is a receptor for *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED. **Nature**, vol. 493, n. 7430, p. 51-55. 2013.

- AMARANTE, C. B.; MÜLLER, A. H.; PÓVOA, M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, vol. 41, n.3, p. 431-434. 2011.
- ANDRADE, L. N.; DARINI, A. L. C. Beta-lactamase producing gram-negative bacilli: which bla bla bla is this?. **Journal of Infection Control**, vol. 6, n.1, p. 16-25. 2017.
- ANISZEWSKI, T. *Alkaloids - chemistry, biological, significance, applications and ecological role*. 2a. ed. Oxford:Elsevier. 2015. 474p.
- ANTINARELLI, L. M. R.; PINTO, N. C.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial activity of some Brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, vol. 87, n. 2, p. 733-742. 2015.
- ANTOSZCZAK, M.; STEVERDING, D.; HUCZYŃSKI, A. Anti-parasitic activity of polyether ionophores. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol 166, n.1, p.32-47. 2019.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Antimicrobianos – Bases teóricas e uso clínico*. 2007. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/lactamicos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/lactamicos.htm)> Acesso em: 03 jun. 2019.
- APERS, S.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L. Lignans and neolignans as lead compounds. **Phytochemistry Reviews**, vol. 2, n.3, p. 201-217. 2003.
- ARAÚJO, E. J. F.; LIMA, L. K. F.; SILVA O. A.; REZENDE JÚNIOR, L. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; CARVALHO, F. A. A.; LIMA, F. C. A.; PESSOA, C.; FREITAS, R. M. (In Memoriam), FERREIRA, P. M. P. In vitro antioxidant, antitumor and leishmanicidal activity of riparin A, an analog of the Amazon alkamides from *Aniba riparia* (Lauraceae). **Acta Amazonica**, vol. 46, n.3, p.309-314. 2016.
- AURICCHIO, M.T.; BACCHI, E.M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, vol.62, n.1, p.55-61. 2003.
- AZAB, S. S.; ABDEL-JALEEL, G. A.; ELDAHSHAN, O. A. Anti-inflammatory and gastroprotective potential of leaf essential oil of *Cinnamomum glanduliferum* in ethanol-induced rat experimental gastritis. **Pharmaceutical Biology**, vol. 55, n.1, p.1654-1661, 2017.
- BAIRD, J. K.; NELWAN, E. J.; TAYLOR, W. R. Approach to the Patient With Malaria. In: KEYSTONE, J. S.; CONNOR, B. A.; MENDELSON, M.; KOZARSKI, P. E.; NOTHDOHT, H. D.; LEDER, K (eds.). *Travel Medicine*. 4ª. ed. China: Elsevier, 2019. 578 p.
- BALASEGARAM, M.; RITMEIJER, K.; LIMA, M. A.; BURZA, S.; GENOVESE, G. O.; MILANI, B.; GASPANI, S.; POTET, J.; CHAPPUIS, F.; Liposomal

- amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert Opinion. Emerging Drugs**, vol. 17, n. 4, p. 493-510. 2012.
- BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Reports**, vol. 24, n.1, p. 1225–1244. 2007.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, vol.6, n.1, p. 71–79. 2016.
- BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; DEMUNER, A. J.; PINHEIRO, P. F.; VAREJÃO, J. O. S.; MONTANARI, R. M. Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de furanonas halogenadas e de compostos análogos aos nostoclídeos. *Quimica Nova*, vol. 33, n. 10, 2020-2026. 2010
- BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M.; YOUNG, C. M. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, vol. 26, n.1, p. 2615-2617. 1987.
- BARBOSA-FILHO, J. M. Lignanans, neolignanans e seus análogos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 486p.
- BARIE, P. S. Multidrug-resistant organisms and antibiotic management. **Surgical Clinics North America**, vol. 92, n. 2, p. 345-391. 2012.
- BARTLETT, S.; BÖSE, D.; GHORI, D.; MECHSNER, B.; PIETRUSZKA, J. Enantiomerically pure allylboronic esters as versatile reagents in the enantioselective synthesis of Dihydro- $\alpha$ -pyrone- containing natural products. **Synthesis**, vol. 45, n. 8, p. 1106-1114. 2013.
- BASTOS, I. S. *Avaliação da atividade antibacteriana, antifúngica e antimalárico de extratos, frações e composto obtidos de plantas da região amazônica*. 2015. 157 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) – Instituto de Pesquisa Leonidas e Maria Deane, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.
- BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; HOELZ, L. V. B.; DE OLIVEIRA, A. P. Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura. **Revista Virtual de Química**, vol. 8, n. 6, p. 2072-2104. 2016.
- BEECH, E.; RIVERS, M.; OLDFIELD, S.; SMITH, P. P. GlobalTreeSearch – the first complete global database of tree species and country distributions. **Journal of Sustainable Forestry**, vol. 36, n.5, p. 454-489. 2017.

- BELLO, A.; DINGLE, T. C. What's That Resistance Mechanism? Understanding Genetic Determinants of Gram-Negative Bacterial. **Clinical Microbiology Newsletter**, vol.40, n.20, p. 165-174. 2018.
- BERN, C. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, vol. 364, n. 26, p. 2527–2534. 2011.
- BIESBROECK, L. K.; FLECKMAN, P. Nail Disease for the Primary Care Provider. **Medical Clinics of North America**, vol. 99, n. 6, p. 1213-26. 2015.
- BITTENCOURT, A.M.; GOTTLIEB, O.R.; MAGESWARAN, S.; MORS, W.B.; OLLIS, W.D.; SUTHERLAND, I.O.; MAGALHÃES, M.T. The natural occurrence of 6-styryl-2-pyrones and their synthesis. **Tetrahedron**, vol. 27, n.1, p. 1043-104. 1971.
- BLANCO, V. R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas. **Revista Virtual de Química**, vol. 9, n. 3, p. 861-876. 2017.
- BOTEGA, C.; PAGLIOSA, F. M.; BOLZANI, V. S.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Benzyloquinoline alkaloids and eudesmane sesquiterpenes from *Ocotea pulchella*. **Phytochemistry**, v.32, n.5, p.1331-3. 1993.
- BRASIL. Ministério da Saúde – Portal da saúde. Malária. 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11347-tratamento>. Acesso em: 22 out. 2017.
- BRAVO, J. A.; SAUVAIN, M.; BALDERRAMA, L.; MORETI, C.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. Alcaloides de la especie *Aniba muca*. **Revista Boliviana de Química**, vol. 13, n.1, p. 19-22. 1996.
- BUITRAGO, E. M.; HERNANDEZ, C.; PALLARES, C.; PACHECO, R.; HURTADO, K.; RECALDE, M. Frequency and antibiotics resistance profiles of microbiological isolates at 13 clinics and referral hospitals in Santiago de Cali – Colombia. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, vol. 18, n.1, p. 3-11. 2014.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, vol. 392, n. 10151, p. 951-970. 2018.
- BUSH, K. Proliferation and significance of clinically relevant B-lactamases. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1277, n.1, p. 84-90. 2013.
- BUTLER, M.S. The role of natural product in chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, vol. 67, n.1, p. 2141–2153. 2004.
- BUTLER, M. S.; BLASKOVICH, M. A.; COOPER, M. A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. **Journal of Antibiotics**, vol.66, n. 10, p.571–591. 2013.

- CABRA, C. R. N. S.; LOPES, B. G. N.; GRANGEIRO JUNIOR, S.; MONTEIRO, D.B.; DOS SANTOS, B. A.; SANTANA, A. K. M. Desenvolvimento do método de dissolução da forma farmacêutica comprimido do Benznidazol 12,5 mg Lafepe. **Brazilian Journal of Health Review**, vol. 2, n.2, p. 2185-2194. 2019.
- CABRAL, M. M.; AZAMBUJA, P.; GOTTLIEB, O. R.; KLEFFMANN, T.; GARCIA, E. S.; SCHAUB, G.A. Burchellin: effects on *Triatoma infestans* and on *Trypanosoma cruzi* within this vector. **Parasitology Research**, vol. 87, n.9, p. 730-735. 2001.
- CALDAS, J. P. A. *Investigação da atividade antileishmania e citotóxica das neolignanas burchelina, grandisina e licarina*. A. 2010. 104f. Universidade Federal da Paraíba (Dissertação de Mestrado), João Pessoa, 2010.
- CALLAWAY, E.; CYRANOSKI, D. Anti-parasite drugs sweep Nobel prize in medicine 2015. **Nature**, vol. 526, n. 7572, p. 174–175. 2015.
- CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 6, n.1, p. 93-100. 1964.
- CAMARGO, S. B.; VASCONCELOS, D. F. S. A. Atividades biológicas de Linalol: conceitos atuais e possibilidades futuras deste monoterpene. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, vol. 13, n.3, p. 381-387. 2014.
- CAMPBELL, J.; SINGH, A. K.; SWOBODA, J. G.; GILMORE, M. S.; WILKINSON, B. J.; WALKER, S. An Antibiotic That Inhibits a Late Step in Wall Teichoic Acid Biosynthesis Induces the Cell Wall Stress Stimulon in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 56, n.4, p. 1810–1820. 2012.
- CAPOTE, R. L. M. Tratamiento supressivo del paludismo en áreas endémicas. **Revista Cubana de Higiene y Epidemiología**, vol. 55, n.3, p. 62-79. 2017.
- CARDOSO, E. A.; RODRIGUES, A.; CARVALHO, G. C. De; GUERRA, A.; FRAGA, M.; LETÍCIA, M.; BARBOSA, D. C.; LUIS, A.; CASTRO, H. C.; LIONE, V. Leishmaniasis: History, Evolution of Treatment and the Need for New Drugs. **Current Biotechnology**, vol.3, n.4, p. 279-188. 2014.
- CARLOS, B. C.; RONA, L. D. P.; CHRISTOPHIDES, G. K.; SOUZA-NETO, J. A. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil, **Pathogens and Global Health**, vol. 113, n. 1, p. 1-13. 2019.
- CASTRO, J. A.; de MECCA, M.M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human and Experimental Toxicology**, vol. 25, n.1, p. 471-479. 2006.
- CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ANTUNES, R. M. P.; ARRUDA, T. A.; PEREIRA, M. S. V.; LIMA, E. O.; GUTIERREZ, S. J. C. Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 37, n.4, p.247-249. 2005.

- CATÃO, R. M. R.; VIEIRA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; ANTUNES, R. M. P.; ARRUDA, T. A.; SILVA, M. A. R. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 42, n.1, p. 9-14. 2010.
- CDC - Center for Diseases Control and Prevention. Malaria: Biology. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>. Acesso em: 01 out. 2017.
- CDC - Center for Diseases Control and Prevention. Parasites – Leishmaniasis: Biology. 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em: 06 jul. 2019.
- CDC - Center for Diseases Control and Prevention. Antiparasitic treatment. 2019. Disponível em: [https://www.cdc.gov/parasites/chagas/health\\_professionals/tx.html](https://www.cdc.gov/parasites/chagas/health_professionals/tx.html). Acesso em: 03 jul. 2019.
- CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungals susceptibility testing of conidium forming filamentous fungi: Approved standard. 2ª. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2008. 35p.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility. Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard M07-A9. 9ª. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012. 112 p.
- COLOTTI, G.; FIORILLO, A.; ILARI, A. Metal- and metalloid-containing drugs for the treatment of trypanosomatid diseases. **Frontiers In Bioscience**, vol. 23, n.1, p. 954-966. 2018.
- COSTA, J. M. L.; COSTA, A. A. U. M. L.; ELKHOURY, A. N.; BEZERRIL, A. C. R.; BARRAL, A.; SALDANHA, A. C. R. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. **Gazeta Médica da Bahia**, vol. 79, n.3, p. 16-24. 2009.
- COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 97, n.1, p. 3-24. 2002.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 104, n.1, p. 31-40. 2009.
- CRAGG, G.M. Paclitaxel (Taxol): A success story with valuable lessons for natural product drug discovery and development. **Medicinal Research Reviews**, vol. 18, n.1, p. 315–331. 1998.
- CRUZ, P. E. O. *Estudo fitoquímico e investigação das atividades antioxidante, antimicrobiana e larvicida das cascas de Annona salzmannii A. DC. (ANNONACEAE)*. 2011. 136f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) – Núcleo de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão, 2011.
- CUNHA, M.L.R.S. et al. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from neonates. **Journal of Pediatrics**, v. 78, n. 8, p. 279-288. 2002.

- CUNHA-NETO, E.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; KALIL, J. Estudo da doença de Chagas: abordagem molecular. **Revista da Sociedade de Cardiologia**, vol. 5, n. 2, p. 217-229. 1995.
- CUSHNIE, T. P. T.; CUSHNIE, B.; LAMB, A. J. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. **International Journal of Antimicrobial Agents**, vol. 44, n.5, p. 377-386. 2014.
- CUSTÓDIO, D. L. *Aproveitamento dos subprodutos da extração do óleo do pau-rosa (Aniba rosaeodora ducke) para a obtenção de bioprodutos*. 2013. 157f. Tese de Doutorado (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.
- CUSTÓDIO, D. L.; VEIGA-JÚNIOR, V. F. Lauraceae alkaloids. **RSC Advances**, vol. 4, n.1, p. 21864-21890. 2014.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol. 74, n. 3, p. 417-433. 2010.
- DAVIS, R. A.; DEMIRKIRAN, O.; SYKES, M. L.; AVERY, V. M.; SURaweera, L.; FECHNER, G. A.; QUINN, R. J. 7',8'-dihydroobolactone, a trypanocidal  $\alpha$ -pyrone from the rainforest tree *Cryptocarya obovata*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 20, n.1, p. 4057-4059. 2010.
- DA SILVA, A.C.N.; DO NASCIMENTO, R.M.C.; RODRIGUES, D.C. DO N.; FERREIRA, P.M.P.; PESSOA, C.; LIMA, D.J.B.; MORAES FILHO, M.O.; DE ALMEIDA, R.M.; FERREIRA, S.R.; FUJIWARA, R.T.; DO NASCIMENTO, A.M. In vitro activity evaluation of seven Brazilian Asteraceae against cancer cells and *Leishmania amazonensis*. **South African Journal of Botany**, vol. 121, n.1, p. 267-273. 2019.
- De ALMEIDA, E. A.; BARBOSA-NETO, R. M.; GUARIENTO, M. E.; WANDERLEY, J. S.; de SOUZA, M. L. Clinical presentation of chronic Chagas disease in elderly individuals. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 40, n.3, p. 311-315. 2007.
- DE BARROS CORRÊA, D.; GOTTLIEB, O. R. Duckein, an alkaloid from *Aniba duckei*. **Phytochemistry**, vol. 14, n. 1, p. 271-272. 1975.
- De LIMA, W.; ROJAS-FERMIN, L. B.; KOTEICH-KHATIB, S.; LUCENA, M. E.; ARZOLAD, J. C. Volatile constituents of the leaves of *Aniba hostmanniana* (Lauraceae) and their antibacterial activities. **Natural Product Communications**, vol. 10, n.7, p. 1321-1322. 2015.
- DE OLIVEIRA SANTOS, G. C.; VASCONCELOS, C. C.; LOPES, A. J.O.; DE SOUSA CARTÁGENES, M. D.S.; FILHO, A. K. D. B.; DO NASCIMENTO, F. R.F.; RAMOS, R. M.; PIRES, E. R. R. B.; DE ANDRADE, M. S.; ROCHA, F. M. G.; DE ANDRADE MONTEIRO, C. Candida Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. **Frontiers in Microbiology**, vol 9, n. 1, p.1351. 2018.

- DE RYCKER, M.; BARAGAÑA, B.; DUCE, S. L.; GILBERT, I. H. Challenges and recent progress in drug discovery for tropical diseases. **Nature**, vol. 559, n. 7715, p. 498-506. 2018.
- DER MARDEROSIAN, A.; BEUTLER, J.A. The Review of Natural Products, 6a ed. St. Louis.: Wolters Kluwer Health, 2010. 1672p.
- DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. **International Journal of Microbiology**, vol. 2014, n.1, p. 1-6. 2014.
- DEWICK, P. M. Medicinal natural product: a biosynthetic approach. 3º edição, John Wiley & Sons, 2009. 550p.
- DIAS, L.C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, vol. 32, n. 9, p. 2444-2457. 2009.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, vol. 2, n. 1, p. 303-336. 2012.
- DIAS, M. V. B.; SANTOS, J. C.; LIBREROS-ZÚÑIGA, G. A.; RIBEIRO, J. A.; CHAVEZ-PACHECO, S. M. Folate biosynthesis pathway: mechanisms and insights into drug design for infectious diseases. **Future Medicinal Chemistry**, vol. 10, n. 8, p. 935-959. 2018.
- DONDORP, A. M.; YEUNG, S.; WHITE, L.; NGUON, C.; DAY, N. P.; SOCHEAT, D.; VON SEIDLEIN, L. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 8, n.4, p. 272-280. 2010.
- DRAGIC, T.; LITWIN, V.; ALLAWAY, G. P.; MARTON, S. R.; HUANG, Y.; NAGASHIMA, K. A. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. **Nature**, vol. 381, n.1, p. 667-673. 1996.
- DUARTE, E. R. *Microbiologia Básica para Ciências Agrárias*. 1ª. ed.. Montes Claros: Instituto de Ciências Agrárias da UFMG. 2011. 129 p.
- DUARTE, S. M. S.; FARIA, F. V.; LIMA, R. M. S.; SAMPAIO, J. S.; MAIA, T. M. B.; GUIMARAES, G. R.; MARTINS, M. O.; DEPRA, L. B. B.; FONSECA, L. S. Revisão Sistemática da Resistência e Farmacodinâmica de Antibióticos. **Brazilian Journal of Development**, vol. 5, n.10, p. 21476-21489. 2019.
- EMAM, S. M.; EL-SALAM, O. H. A. Real-time PCR: A rapid and sensitive method for diagnosis of dermatophyte induced onychomycosis, a comparative study. **Alexandria Journal of Medicine**, vol. 52, n.1, p. 83-90. 2016.
- ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 26, n. 1, p. 58–85. 2013.

- FARHOUR, Z.; MEHRAJ, V.; CHEN, J.; RAMENDRA, R.; LU, H.; ROUTY, J.P. Use of (1→3)-  $\beta$ -D-glucan for diagnosis and management of invasive mycoses in HIV-infected patients. **Mycoses**, vol. 61, n.10, p. 718-722. 2018.
- FAZLUL, M. K. K.; SHAH, S. R.; NAZMUL, M. H. M.; ZAIDUL, I.S.M.; BAHARUDIN, R.; RAMLI, A. N. M. A clinical update on Antibiotic Resistance Gram-negative bacteria in Malaysia- a review. **Journal of International Pharmaceutical Research**, vol. 45, n. 1, p. 270-283. 2019.
- FELSEMBURGH, C. A.; PELEJA, V. L.; DO CARMO, J. B. Fenologia de *Aniba parviflora* (Meins.) Mez. em uma região do estado do Pará, Brasil. **Biota Amazônia**, vol. 6, n. 3, p. 31-39. 2016.
- FENG, M.-T.; YU, X.-Q.; YANG, P.; YANG, H.; LIN, K.; MAO, S.-C. Two New Antifungal Polyunsaturated Fatty Acid Ethyl Esters from the Red Alga *Laurencia okamurai*. **Chemistry of Natural Compounds**, vol. 51, n. 3, p. 418–422. 2015.
- FERNANDES, N. S. *Investigação de alcaloides de Lauraceae da Amazônia como tratamento para tripanossomíase e leishmaniose: avaliação fenotípica e busca de alvos moleculares*. 2017. 213 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.
- FERNANDES, J. B.; GOTTLIEB, O. R.; MAIA, J. G. S. Neolignans from na *Aniba* species. **Phytochemistry**, vol. 15, n.1, p. 1033-1036. 1976.
- FERNANDES, J. B.; GOTTLIEB, O. R.; XAVIER, L. M. Chemosystematics implications of flavonoids in *Aniba riparia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, vol. 6, n.1, p. 55-58. 1978.
- FIELD, M. C.; HORN, D.; FAIRLAMB, A. H.; FERGUSON, M. A. J.; GRAY, D. W.; READ, K. D.; DE RYCKER, M.; TORRIE, L. S.; WYATT, P. G.; WYLLIE, S.; GILBERT, I. H. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 15, n.4, p. 217-231. 2017.
- FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 81, n. 5, p. 755–759. 1987.
- FRANCA, N. C.; GOTTLIEB, O. R.; SUAREZ, A. M. P. 6-phenylethyl-5,6-dihydro-2-pyrone from *Aniba gigantifolia*. **Phytochemistry**, vol. 12, n. 5, p. 1182-1184. 1973.
- FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: Aspectos Históricos e Quimioterapia. **Química Nova**, v.31, n. 5, p. 1271-1278. 2008.
- FURUSE, Y. Analysis of research intensity on infectious disease by disease burden reveals which infectious diseases are neglected by researchers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n.2, p.478-483. 2019.

- GAO, J.; WANG, H.; LI, Z.; WONG, A. H.; WANG, Y.; GUO, Y.; LIN, X.; ZENG, G.; LIU, H.; WANG, Y.; WANG, J. *Candida albicans* gains azole resistance by altering sphingolipid composition. **Nature Communications**, vol. 9, n.1, p. e4495. 2018.
- GARCIA, L. V.; ROURA, M.; PELL, C.; POSADA, E.; GÁSCON, J.; ALDASORO, E.; MUÑOZ, J.; POOL, R. Socio-Cultura Aspects of Chagas Disease: A systematic review of qualitative research. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, vol. 7, n.9, p.e2410. 2013.
- GEORGIEV, M.I. Natural products utilization. **Phytochemistry Reviews**, vol. 13, n.2, p. 339-341. 2014.
- GIOCONDO, M. P.; BASSI, C. L.; TELASCRÊA, M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; AGUSTONI, D.; MELLO, E. R.; SOARES, C. P. Cryptomoschatone D2 from *Cryptocarya mandioccana*: cytotoxicity against human cervical carcinoma cell lines. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, vol. 30, n. 3, p. 315-322. 2009.
- GIONGO, J. L.; VAUCHER, R.A.; SILVA, A.S.; OLIVEIRA, C.B.; MATTOS, C.B.; BALDISSERA, M. D.; SAGRILLO, M. R.; MONTEIRO, S. G.; CUSTÓDIO, D. L.; MATOS, M. S.; SAMPAIO, P. T.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Trypanocidal activity of the compounds present in *Aniba canellila* oil against *Trypanosoma evansi* and its effects on viability of lymphocytes. **Microbial Pathogenesis**, vol. 103, n.1, p. 13-18. 2017.
- GOBBO-NETO, L., LOPES, N.P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, vol. 30, n.1, p. 374-38. 2007.
- GOH, E. B.; YIM, G.; TSUI, W.; MCCLURE, J.; SURETTE, M. G.; DAVIES, J. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, vol. 99, n. 26, p.17025-17030. 2002.
- GOMES, A. P.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; MENDONÇA, E. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, vol. 23, n.3, p.358-369. 2011.
- GONCALVES, N. B.; CORREA FO, J. C.; GOTTLIEB, O. R. Analeptic Action of Anibine. **Nature**, vol. 182, n. 4640, p. 938-939. 1958.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, vol. 7, n. 3, p. 338-349. 2004.
- GOTTLIEB, O.R.; MORS, W.B. Isolation of 5,6-dehydrokawain from *Aniba firmula* Mez. The **Journal of Organic Chemistry**, vol. 24, n.1, p. 17-18. 1959.
- GOTTLIEB, O. R.; SILVA, M. L.; FERREIRA, Z. S. Neolignans from *Aniba terminalis*. **Phytochemistry**, vol. 14, n.1, p.1825-1827. 1975.
- GOTTLIEB, O. R.; KUBITZKI, K. Chemosystematics of *Aniba*. **Biochemical Systematics and Ecology**, vol. 9, n.1, p.5-12. 1981.

- GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. Neolignanas antitumorais. *Ciência e Cultura*, vol. 32, n.1, p. 93 – 100. 1978.
- GROOM, Z. C.; PROTOPAPAS, A. D.; ZOCHIOS, V. Tropical diseases of the myocardium: a review. **International Journal of General Medicine**, vol. 10, n.1, p. 101-111. 2017.
- GROVE, D. C.; RANDALL, W. A. Assay Methods of Antibiotic: a Laboratory Manual, Medical Encyclopedia: New York, 1955. 264p.
- GUGLIELMO, Z.; RODRÍGUEZ, N.; OVIEDO, H. Tratamientos para la Leishmaniasis. **Revista de la Facultad de Medicina**, vol. 41, n.1, p. 4-26. 2018.
- GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, vol.24, n.70, p.81-98. 2010.
- GUIMARÃES, A.; VENANCIO, A.; ABRUNHOSA, L. Antifungal effect of organic acids from lactic acid bacteria on *Penicillium nordicum*. **Food Additives & Contaminants. - Part A**, vol. 35, n.1, p.1803–1818. 2018.
- HAILU, T.; YIMER, M.; MULU, W.; ABERA, B. Challenges in visceral leishmaniasis control and elimination in the developing countries: A review. **Journal of Vector Borne Diseases**, vol. 53, n.3, p. 193-198. 2016.
- HANI, U.; SHIVAKUMAR, H. G.; VAGHELA, R.; OSMANI, R. A.; SHRIVASTAVA, A. Candidiasis: a fungal infection—current challenges and progress in prevention and treatment. **Infectious Disorders Drug Targets**, vol. 5, n. 1, p.42-52. 2015.
- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, vol. 14, n. 2, p. 111–129. 2015.
- HOTEZ, P. J.; ALVARADO, M.; BASÁÑEZ, M-G.; BOLLIGER, I.; BOURNE, R.; BOUSSINESQ, M., et al. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 8, n. 7, p. e2865. 2014.
- IORIZZO, M. Tips to Treat the 5 Most Common Nail Disorders. **Dermatologic Clinics**, vol. 33, n. 2, p. 175–183. 2015.
- ISO - International Organization for Standardization. 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009.
- JAYASURIYA, H. et al. Isolation and structure of antagonists of chemokine receptor (CCR5). **Journal of Natural Products**, vol. 67, n. 6, p. 1036-1038. 2004.
- KAHL, B. C.; BELLING, G.; REICHEL, R.; HERRMANN, M.; PROCTOR, R. A.; [PETERS](#), G. Thymidine-dependant small colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultra-structural changes consistent with

- impaired cell separation. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 41, n.1, p. 410–413. 2003.
- KAPELUSZNIK, L.; VARELA, D.; MONTGOMERY, S. P.; SHAH, A. N.; STEURER, F. J.; RUBINSTEIN, D.; FACTOR, S. H. Chagas disease in Latin American immigrants with dilated cardiomyopathy in New York City. **Clinical Infectious Disease**, vol. 57, n.1, p.e7. 2013.
- KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, vol. 33, n.3, p. 300-305. 2017.
- KAVITHA, M. K. Antifungal drug resistance in *Candida* sp. – a review. **World Journal of Pharmaceutical Research**, vol. 7, n. 16, 125-132. 2018.
- KIPRE, B. G.; GUESSENND, N.; KONÉ, M. W.; GBONON, V.; COULIBALY, J. K.; DOSSO, M. Antibacterial activity of the stem bark of *Tieghemella Heckelii* Pierre ex. A Chev against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, vol. 17, n.1, p. 170. 2017.
- KLAUSMEYER, P. et al. A Novel Antimicrobial Indolizinium Alkaloid from *Aniba panurensis*. **Journal of Natural Products**, vol. 67, n. 10, p. 1732-1735. 2004.
- KLEIN-JÚNIOR, L. C.; HENRIQUES, A. T. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. 1ª ed.. Porto Alegre: Artmed, 2017. 486p.
- KOFIE, W.; FETSE, J. P.; ADOSRAKU, R. K.; Antimicrobial Activities of Novel Xylopic Acid Derivatives. **Journal of Advances in Microbiology**, vol. 14, n. 1, p. 1-6. 2019.
- KONG, H.; FANG, L.; JIANG, R.; TONG, J. Distribution of sasX, pvl, and qacA/B genes in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from East China. **Infection and Drug Resistance**, vol. 11, n.1, p. 55-59. 2018.
- KRISHNA, P.V.M.; REDDY, V.S.; KUMAR, V.P.; SURESH, P. Antibiotic susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* and methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* isolated from various clinical specimens in a tertiary care teaching hospital, Pondicherry **Indian Journal of Public Health Research and Development**, vol. 10, n.2, p. 208-213. 2019.
- KUPCHAN, S. M.; STEVENS, K. L.; ROHLFING, E. A.; SICKLES, B. R.; SNEDEN, A. T.; MILLER, R. W.; BRYAN, R. F. New Cytotoxic Neolignans from *Aniba megaphylla* Mez. **The Journal of Organic Chemistry**, vol. 43, n.4, p. 586-590. 1978.
- LLANOS-CUENTAS, A.; LACERDA, M. V.G.; HIEN, T. T.; VÉLEZ, I. D.; NAMAIIK-LARP, C.; CHU, C. S.; VILLEGAS, M. F.; VAL, F.; MONTEIRO, W. M.; BRITO,

M. A. M.; COSTA, M. R. F.; CHUQUIYAURI, R.; CASAPÍA, M.; NGUYEN, C. H.; ARUACHAN, S.; PAPWIJITSIL, R.; NOSTEN, F. H.; BANCONE, G.; ANGUS, B.; DUPARC, S.; CRAIG, G.; ROUSELL, V. M.; JONES, S. W.; HARDAKER, E.; CLOVER, D. D.; KENDALL, L.; MOHAMED, K.; KOH, G.C.K.W., WILCHES, V. M.; BRETON, J. J.; GREEN, J. A. Tafenoquine versus Primaquine to Prevent Relapse of *Plasmodium vivax* Malaria. **The New England Journal of Medicine**, vol 380, n.3, p. 229-241. 2019.

LAMMIE, S. L.; HUGHES, J. M. Antimicrobial Resistance, Food Safety, and One Health: The Need for Convergence. **Annual Review of Food Science and Technology**, vol. 7, n.1, p. 287-312. 2016.

LAVANIA, M.; SINGH, I.; TURANKAR, R. P.; GUPTA, A.; AHUJA, M.; PATHAK, V.; SENGUPTA, U. Enriched whole genome sequencing identified compensatory mutations in the RNA polymerase gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium leprae* strains. **Infection and Drug Resistance**, vol. 11, n.1, p.169–175. 2018.

LAZARIN-BIDÓIA, D.; DESOTI, V. C.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V; SILVA, S. O. Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoid-5: confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. **Free radical biology & medicine**, vol. 60, n.1, p. 17–28. 2013.

LEKPHROM, R.; KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K. Bioactive styryllactones and alkaloid from flowers of *Goniothalamus laoticus*. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 125, n.1, p. 47–50. 2009.

LEMOS, M. D. A.; SOUSA, O. H.; SILVA, Z. S. S. B. Perfil da leishmaniose visceral no Brasil: uma revisão bibliográfica. **Facit Business and Technology Journal**, vol.9, n. 1, p. 93-114. 2019.

LI, G.; LOU, H. X. Strategies to diversify natural products for drug Discovery. **Medicinal Research Reviews**, p. 1-40. 2017.

LIMA, O. A.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Burchellin, a neolignan from *Aniba burchellii*. **Phytochemistry**, vol. 11, n.1, p. 2031-2037. 1972.

LJUNGSTRÖM, I.; PERLMANN H.; SCHICHTHERLE, M.; SCHERF A.; WAHLGEN M. *Methods in Malaria Research*, 4<sup>a</sup>. ed. Manassas: MR4/ATCC, 2004. 130 p.

LOPES, E. G.; GERALDO-JUNIOR, C. A.; MARCILI, A.; SILVA, R. D.; KEID, L. B.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; SOARES, R. M. Performance of conventional PCRs based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of *Leishmania* spp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, vol. 58, n. 41, p. 1-7. 2016.

LUPE, F.A. *Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia*. 2007. 103f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. *Microbiologia de Brock*. 14a. ed.. Porto Alegre: Artmed, 2016. 1032p.
- MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSONLILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multi-drug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 18, n. 1, p. 268-281. 2012.
- MAHAMAT A.; GBAWENG, A. J. Y.; FOTSING, M. T.; TALLA, E.; FEKAM, F. B.; HENOUMONT, C.; SOPHIE, L.; MBAFOR, J. T. Two new flavones glycosides with antimicrobial activities from *Clerodendrum formicarum* Gürke (Lamiaceae), **Natural Product Research**. vol. 31, n.1, p. 1-9. 2019.
- MALEBO, H.M.; KIHAMPA, C.; MGINA, C. A.; SUNG’HWA, F.; WAIBEL, R.; JONKER, S. A.; NKUNYA. M. H. H. Antifungal Enantiomeric Styrylpyrones from *Sanrafaelia ruffonammari* and *Ophrypetalum odoratum*. **Natural Products and Bioprospecting**, vol. 4, n.2, p. 129-133. 2014.
- MALYAVANTAM, C.; SHARMA, P.; PRAKASH, D. A Study on Phytochemicals from Medicinal Plants Against Multidrug Resistant *Streptococcus mutans*. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, vol. 25, n.1, p. 1581–1593. 2019.
- MARCANO-PACHECO, E.; PADILLA-BARETIC, A.; ROJAS-FERMIN, L.; MORA-VIVAS, F. D.; FERRER-PEREIRA, H. Composicion quimica del aceite esencial de madera de *Aniba cinnamomiflora* C. K. Allen, Andes Venezolanos. **Colombia Forestal**, vol. 19, n. 2, p. 233-235. 2016.
- MARQUES, C. A. Importância Econômica da Família Lauraceae Lindl. **Floresta e ambiente**, vol. 8, n.1, p. 195-206. 2001.
- MARTINEZ-ROSSI, N. M.; BITENCOURT, T. A.; PERES, N. T. A.; LANG, E. A. S.; GOMES, E. V.; QUARESEMIN, N. R.; MARTIN, M. P.; LOPES, L.; ROSSI, A. Dermatophyte Resistance to Antifungal Drugs: Mechanisms and Prospectus. **Frontiers in Microbiology**, vol. 9, n.1, p. e1108. 2018.
- MARTINS, C.V.B.; RESENDE, M.A.; DA SILVA, D.L.; MAGALHÃES, T.F.F.; MODOLO, L.V. ; PILLI, R.A.; DE FA´TIMA, A. In vitro studies of anticandidal activity of goniothalamine enantiomers. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 107, n.1, p. 1279–1286. 2009.
- MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 146, n.4, p. 601–620. 2007.

- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, vol. 4, n. 2, p. 119-128. 2013.
- MCCRACKEN, S. T.; KAISER, M.; BOSHOFF, H. I.; BOYD, P. D. W.; COPP, B. R. Synthesis and antimalarial and antituberculosis activities of a series of natural and unnatural 4-methoxy-6-styryl-pyran-2-ones, dihydro analogues and photo-dimers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 20, n.1, p. 1482-1493. 2012.
- MELETI, V. R. *Obtenção e avaliação das atividades antiparasitárias de (±)-licarina A e alguns de seus derivados semissintéticos*. 2012. 100f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de Franca, Franca, 2012.
- MELO, C. T. V.; CARVALHO, A. M. R.; MOURA, B. A.; TEIXEIRA, C. P. L.; VASCONCELOS, L. F.; FEITOSA, M. L.; OLIVEIRA, G. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; SOUSA, F. C. F. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, vol. 27, n.1, p.104-112. 2011.
- MENDONÇA, D. V. C.; MARTINS, V. T.; LAGE, D. P.; DIAS, D. S.; RIBEIRO, P. A. F.; CARVALHO, A. M. R. S.; DIAS, A. L. T.; MIYAZAKI, C. K.; MENEZES-SOUZA, D.; ROATT, B. M.; TAVARES, C. A. P.; BARICHELLO, J. M.; DUARTE, M. C.; COELHO, E. A. F. Comparing the therapeutic efficacy of different amphotericin B-carrying delivery systems against visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, vol. 186, n.1, p. 24–35. 2018.
- MENEZES, A. L. R.; OLIVEIRA, G. F.; RIBEIRO, M. A. L.; CASTRO, G. V. S.; LIMA, R. A.; MENEGUETTI, D. U. O. Epidemiological overview of chagas disease in the state of Amazonas, from 2004 to 2014. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, vol. 9, n.2, p. 1-12. 2018.
- MIMICA, M. J. Atualização sobre detecção laboratorial de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus*. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, vol. 57, n.1, p. 129-134. 2012.
- MORAES, P. L. R. Sinopse das Lauráceas nos estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **Biota Neotropica**, vol.5, n. 2, P. 253-270. 2005.
- MORAIS, A. A.; REZENDE, C. M. A. M.; VON BÜLOW, M. V.; MOURÃO, J. C.; GOTTLIEB, O. R.; MARX, M. C.; ROCHA, A. I.; MAGALHAES, M. T. Óleos essenciais de espécies do gênero *Aniba*. *Acta Amazonica*, vol. 2, n.1, p. 41-44. 1972.
- MOREIRA, R. R. D.; SANTOS, A. G.; CARVALHO, F. A.; PEREGO, C. H.; CREVELIN, E. J.; CROTTI, A. E. M.; COGO, J.; CARDOSO, M. L. C.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of *Melampodium divaricatum* and *Casearia sylvestris* essential oils on *Leishmania amazonensis*. **Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 61, e33, p.1-7. 2019.

- MORS, W. B.; GOTTLIEB, O. R.; DJERASSI, C. The chemistry of rosewood. Isolation and structure of anibine and 4-methoxyparacotoin1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, n. 16, p. 4507-4511. 1957.
- MORS, W. B.; MAGALHÃES, M. T.; GOTTLIEB, O. R. The chemistry of the genus *Aniba*. X. *Aniba fragrans* Ducke, a valid species. **Anais de Associação Brasileira de Química**, vol. 19, n.1 p. 193-197. 1960.
- MORS, W. B.; MAGALHÃES, M. T.; LIMA, O. A.; GOTTLIEB, O. R. Isolamento e síntese de 11-metoxi-iangonina e 5,6-dehidromesticina. **Anais da Associação Brasileira de Química**, vol. 21, n.1, p. 7-12. 1962.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, vol. 65, n.1-2, p. 55-63. 1983.
- MUKHERJEE, A.; PADMANABHAN, P. K.; SAHANI, M. H.; BARRETT, M. P.; MADHUBALA, R. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, vol. 145, n.1, p. 1-10. 2006.
- MUNITA, J.M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, vol. 4, n. 2, p. 481-511. 2016.
- MURCIA, L.; CARRILERO, B.; MUNOZ-DAVILA, M. J.; THOMAS, M. C.; LÓPEZ, M. C.; SEGOVIA, M. Risk factors and primary prevention of congenital Chagas disease in a nonendemic country. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 56, n.4, p. 496-502. 2013.
- NAKAYAMA, G. R.; CATON, M.C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. **Journal of immunological methods**, vol. 204, n. 2, p. 205-208. 1997.
- NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. 12a. Edição. Rio de Janeiro: Atheneu. 2012. 576p.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, vol. 70, n.1, p. 461-477. 2007.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, vol. 79, n. 3, p. 629-661. 2016.
- NGO, L. T.; OKOGUN, J. I.; FOLK, W. R. 21st Century natural product research and drug development and traditional medicines. **Natural Products Report**, vol. 30, n.1, p. 584-592. 2013.
- NIETO, J.; ALVAR, J.; RODRÍGUEZ, C.; SAN ANDRÉS, M. I.; SAN ANDRÉS, M. D.; GONZÁLEZ, F. Comparison of conventional and lipid emulsion formulations of amphotericin B: Pharmacokinetics and toxicokinetics in dogs. **Research in Veterinary Science**, vol.117, n.1, p. 125-132. 2018.

- OGER, J. M.; RICHOMME, P.; GUINAUDEAU, H.; BOUCHARA, J. P.; FOURNET, A. *Aniba canellila* (H.B.K.) Mez Essential Oil: Analysis of Chemical Constituents, Fungistatic Properties. **Journal of Essential Oil Research**, vol. 6, n. 5, p. 493-497. 1994.
- OLIVEIRA, A.D.D. et al. Laboratory detection methods for methicillin resistance in coagulase negative *Staphylococcus* isolated from ophthalmic infections. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 70, n. 2, p. 667-675. 2007.
- OLIVEIRA, L.B.S.; BATISTA, A.H.M.; FERNANDES, F.C.; SALES, G.W.P.; NOGUEIRA, N.A.P. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol. 18, n.2, p. 511-523. 2016.
- ORHAN, I.; BERRIN ÖZCELIK, B.; KARAOGLU, T.; SENER, B. Antiviral and Antimicrobial Profiles of Selected Isoquinoline Alkaloids from *Fumaria* and *Corydalis* Species. **Zeitschrift für Naturforschung**, vol. 62, n.1, p. 19-26. 2007.
- OSUNTOKUN, O. T.; IBUKUN, A. F.; YUSUF-BABATUNDE, A. M.; ABIODUN, S. Pre/Post-Plasmid Profile Analysis, Killing- Kinetics Page 12 of 17 and Secondary Metabolites Screening Of *Adenopus breviflorus* (Benth) Fruit Extract Against Multiple Drug Resistant Isolates Using *Staphylococcus aureus* (MDRSA) as a Case Study. **Journal of Advanced Research in Biotechnology**, vol. 4, n.1, p. 1-17. 2019.
- OTA, M. Pseudo-onychomycosis. **The Lancet Infectious Diseases**, vol. 17, n. 2, p. 235. 2017.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à Espectroscopia. 4<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 692 p.
- PEDRO, R. S. *Tratamento farmacológico da malária em um instituto de pesquisa clínica no Rio de Janeiro*. 2011. 78 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas). Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.
- PERES, N. T. A.; MARANHÃO, F. C. A.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, vol. 85, n. 5, p.657-667. 2010.
- PÉREZ, E. G.; SÁEZ, J.; CASSELS, B. K. A convenient, renewable source of the anxiolytic proaporphine alkaloid glaziovine: *Duguetia vallicola* leaves. **Journal Chilean Chemical Society**, vol. 50, n.3, p. 553-557. 2005.
- PERIM, M. C.; BORGES, J. C.; SILVA, E. M.L.; ARAÚJO, T. A. S.; SILVA, A. C. O.; SILVA, V. C.; CARREIRO, S. C.; CUNHA, A. F.; PRANCHEVICIUS, M. C. S. *In vitro* antibacterial and time-kill assay of ethanolic extract of *Davilla nitida* bark on multidrug resistant bacteria isolated from diabetic foot lesions, **Natural Product Research**, vol. 33, n.16, p. 2383-2388. 2018.

- PERON, F.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; DIN, Z. U.; RODRIGUES-FILHO, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; SILVA, S. O. S.; NAKAMURA, C. V. Effects of (1E,4E)-2-Methyl-1,5-bis(4-nitrophenyl)penta-1,4-dien-3-one on *Trypanosoma cruzi* and Its Combinational Effect with Benznidazole, Ketoconazole, or Fluconazole. **BioMed Research International**, vol. 2017, Article ID 7254193, p. 1-11. 2017.
- PINAZO, M. J.; MUNOZ, J.; POSADA, E.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; GÁLLEGO, M.; AYALA, E.; CACHO, E.; SOY, D.; GASCON, J. Tolerance of Benznidazole in Treatment of Chagas' Disease in Adults. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 54, n.11, p. 4896–4899. 2010.
- POUR, M.; ŠPULÁK, M.; BALŠÁNEK, V.; KUNEŠ, J.; BUCHTA, V.; WAISSER, K. 3-Phenyl-5-methyl-2H,5H-furan-2-ones: tuning antifungal activity by varying substituents on the phenyl ring. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 10, n. 16, p. 1893–1895. 2000.
- POUR, M.; ŠPULÁK, M.; BUCHTA, V.; KUBANOVÁ, P.; VOPRŠALOVÁ, M.; WSÓL, V.; SCHILLER, R. 3-Phenyl-5-acyloxymethyl-2H,5H-furan-2-ones: Synthesis and Biological Activity of a Novel Group of Potential Antifungal Drugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 44, n. 17, p. 2701–2706. 2001.
- POUR, M.; ŠPULÁK, M.; BALŠÁNEK, V.; KUNEŠ, J.; KUBANOVÁ, P.; BUCHTA, V. Synthesis and structure–antifungal activity Relationships of 3-Aryl-5-alkyl-2,5-dihydrofuran-2-ones and Their Carbanalogues: further refinement of tentative pharmacophore group. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 11, n. 13, p. 2843–2866. 2003.
- QUINET, A. Sinopse taxonômica da família Lauraceae no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, vol. 19, n.3, p. 563-572. 2005.
- QUINET, A.; BAITELLO, J.B.; MORAES, P.L.R. DE; ASSIS, L.; ALVES, F.M. 2015. *Lauraceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB143>>. Acesso em 06 mar. 2017.
- RABELO, D. M.; PINHEIRO, M.L.B.; BARISON, A.; SALOMÉ, K.S.; COSTA, E. V.; SILVA, F.M.A.; CHAVES, Y.O.; BASTOS, I. S.; Isoquinoline alkaloids and investigation of the antibacterial and antiplasmodial activities of *Guatteria citriodora* (Annonaceae). **Química Nova**, vol. 37, n.9. 2014.
- REDDY, D. K.; SHEKHAR, V.; PRABHAKAR, P.; BABU, B. C.; SIDDHARDHA, B.; MURTHY, U. S. N. Stereoselective synthesis and biological evaluation of (R)-rugulactone, (6R)-((4R)-hydroxy-6-phenyl-hex-2-enyl)-5,6-dihydro-pyran-2-one and its 4S epimer. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 45, n.1, p. 4657-4663. 2010.
- REDDY, K. R. Current Perspectives on Leishmaniasis. **Journal of Gandaki Medical College-Nepal**, vol. 12, n.1, p. 1-13. 2019.

- REITHINGER, R.; DUJARDIN, H. LOUZIR, J.C.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, vol. 7, n. 9, p. 581-596. 2007.
- REZENDE, C.M.A. M.; VON BÜLOW, M.V.; GOTTLIEB, O.R.; PINHO, S.L.V.; ROCHA, A.I. The 2-pyrones of *Aniba* species. **Phytochemistry**, vol. 10, n.1, p. 3167-3172. 1971.
- REZENDE, B. A., SILVA, G. C.; CORRADI, R. MG.; TELES, M. M. R. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LEMOS, V. S.; CORTES, S. F. Dihydrogoniothalamine, an Endothelium and No-Dependent Vasodilator Drug Isolated from *Aniba panurensis*. **Planta Medica**, vol.81, n.1, p. 1375-1381. 2015.
- RICARDO, M. A. G.; ANDRECO, M. A.; CAVALHEIRO, A. J.; CASTRO-GAMBOA, I. C.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S. Bioactive pyrones and flavonoids from *Cryptocarya aschersoniana* seedlings. **Arkivoc**, vol. 6, n.1, p. 127-136. 2004.
- RINALDI, M. V. N.; DÍAZ, I. E. C.; SUFFREDINI, I. B.; MORENO, P. R. H. Alkaloids and biological activity of beribá (*Annona hypoglauca*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 27, n.1, p. 77-83. 2017.
- RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. *Cell viability assays. Assay Guidance Manual*. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. Acesso em: 02 jan. 2019.
- ROCHA, M. O. C.; PEDROSO, E. R. P. *Fundamentos em Infectologia*. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Editora Rubia Ltda, 2009. 1120p.
- RODRIGUES J.C.F.; GODINHO J.L.P.; DE SOUZA W. Biology of Human Pathogenic Trypanosomatids: Epidemiology, Lifecycle and Ultrastructure. In: Santos A., Branquinha M., d'Avila-Levy C., Kneipp L., Sodré C. (eds) *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma. Subcellular Biochemistry*, 1ª. ed. Dordrecht: Springer, 2014. 381p.
- ROEMER, T.; KRYSAN, D. J. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, vol. 4, n.1, p. a019703- a019703. 2014.
- ROSS, L. S.; FIDOCK, D. A. Elucidating Mechanisms of Drug-Resistant *Plasmodium falciparum*. **Cell Host & Microbe**, vol. 26, n.1, p. 35-47. 2019.
- ROSSI, M. H.; YOSHIDA, M.; MAIA, J. G. S. Neolignans, styrylpyrones and flavonoids from an *Aniba* species. **Phytochemistry**, vol. 45, n. 6, p. 1263-1269. 1997.
- RYSSEL, H.; KLOETERS, O.; GERMANN, G.; SCHÄFER, T.; WIEDEMANN, G.; OEHLBAUER, M. The antimicrobial effect of acetic acid-An alternative to common local antiseptics? **Burns**, vol. 35, n.1, p. 695-700. 2009.

- SALLEH, W. M.; AHMAD, F.; YEN, K. H. Antioxidant and anticholinesterase activities of essential oils of *Cinnamomun griffithii* and *C. macrocarpum*. **Natural Product Communications**, vol. 11, n.5, p. 695-698. 2015.
- SAMPAIO, P. T. B.; SIQUEIRA, J. A. S.; COSTA, S.; BRUNO, F. M. S. Propagação vegetativa por miniestacas de preciosa (*Aniba canellila* (H. B.K) MEZ). **Acta Amazônica**, v 40, n. 4, p. 687-692. 2010.
- SANTOS, M. M.; MESQUITA, A. A. L.; GOTTLIEB, O. R. A química das lauráceas brasileiras. LXX. Estirilpironas de *Aniba kappleri*. **Acta amazonica**, vol. 12, n.3, p. 668-670. 1982.
- SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 103, n.3, p. 277-281. 2008.
- SANTOS, L. S.; DAMASCENO, N. S.; SOUTO, R. C. F. RESISTÊNCIA de bactérias Gram-positivas isoladas de infecção do trato urinário no LAC/PUC – Goiás. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 51, n.2, p.143-148. 2019.
- SANYAL, D.; GREENWOOD, D. An electron microscope study of glycopeptide antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Medical Microbiology**, vol. 39, n.1, p. 204–210. 1993.
- SCHUSTER, F.L.; SULLIVAN, J. J. Cultivation of clinically significant hemoflagellates, **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 15, n. 3, p. 379-389. 2002.
- SEYDLOVÁ, G.; SOKOL, A.; LIŠKOVÁ, P.; KONOPÁSEK, I.; FIŠER, R. Daptomycin pore formation and stoichiometry depend on membrane potential of target membrane. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, vol. 63, n.1, p. e01589-18. 2019.
- SEYED, M. A.; JANTAN, I.; BUKHARI, S. N. A. Emerging Anticancer Potentials of Goniotalamin and Its Molecular Mechanisms. **Biomed Research International**, vol. 2014, n.1, p. 1-10. 2014.
- SHARAFUTDINOV, I. S.; TRIZNA, E. Y.; BAIDAMSHINA, D. R.; RYZHIKOVA, M. N.; SIBGATULLINA, R. R.; KHABIBRAKHMANOVA, A. M.; LATYPOVA, L. Z.; KURBANGALIEVA, A. R.; ROZHINA, E. V.; KLINGER-STROBEL, M.; FAKHRULLIN, R. F.; PLETZ, M. W.; BOGACHEV, M. I.; KAYUMOV, A. R.; MAKAREWICZ, O. Antimicrobial Effects of Sulfonyl Derivative of 2(5H)-Furanone against Planktonic and Biofilm Associated Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Microbiology**, vol. 8, n.1, p. e2246. 2017.
- SHARMA, V.; SARKAR, I. N. Leveraging biodiversity knowledge for potential phyto-therapeutic applications. **Journal of the American Medical Informatics Association**, vol. 20, n. 4, p. 668–79. 2013.

- SHEN, S.; ZHANG, T.; YUAN, Y.; LIN, S.; XU, J.; YE, H. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. **Food Control**, vol. 47, n.1, p. 196-202. 2015.
- SHIELDS, B. E.; TSCHETTER, A. J.; WANAT, K. A. *Staphylococcus simulans*: An emerging cutaneous pathogen. **JAAD Case Reports**, vol. 2, n.6, p. 428-429. 2016.
- SIANGLUM, W.; SRIMANOTE, P.; WONGLUMSOM, W.; KITTINIYOM, K.; VORAVUTHIKUNCHAI, S.P. Proteome analyses of cellular proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated with rhodomyrtonone, a novel antibiotic candidate. **PLoS ONE**, vol. 6, n.1, p. 1–10. 2011.
- SILVA, K. C; KNÖBL, T.; MORENO, A. M. Antimicrobial resistance in veterinary medicine: mechanisms and bacterial agents with the greatest impact on human health. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, vol. 50, n. 3, p. 171-183. 2013.
- SILVA, L. R.; VALE, M. L.; CALOU, B. F. I.; MEIRELES DE DEUS, M. S.; FERREIRA, P. M. P.; PERON, A. P. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta Toxicológica Argentina**, vol. 23, n.1, p. 36-43, 2015a.
- SILVA, R. O.; DAMASCENO, S. R. B.; SILVA, I. S.; SILVA, V. G.; BRITO, C. F. C.; TEIXEIRA, A. E. A.; NUNES, G. B. L.; CAMARA, C. A.; FILHO, J. M. B.; GUTIERREZ, S. J. C.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P.; BARBOSA, A. L. R.; FREITAS, R. M.; MEDEIROS, J. V. R. Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **Chemico-Biological Interactions**, vol. 229, n.1, p. 55–63. 2015b.
- SILVA, J. K.; TRINDADE, R. C.; MAIA, J. G.; SETZER, W. N. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of *Endlicheria arenosa* (LAURACEAE) from the Amazon. **Natural Product Communications**, vol. 11, n.5, p. 695-698, 2016.
- SILVA, M. O.; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, vol. 8, n. 4, p. 1-11. 2018.
- SILVA, Y. C. *Estudo de marcadores em espécies de Aniba (Lauraceae) bioativas da Amazônia*. 2018. 179 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.
- SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRILL, T. C., *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 8ª.ed. Rio de Janeiro:LTC, 2019. 468 p.
- SIMIC, A.; SOKOVIC, M. D.; RISTIC, M.; GRUJIC-JOVANOVIC, S.; VUKOJEVIC, J.; MARIN, P. D. The Chemical Composition of some Lauraceae Essential Oils and Their Antifungal Activities. **Phytotherapy Research**, vol. 18, n.1, p. 713-717. 2004.

- SOUZA, A. D. *Isolamento de alcaloides e atividades biológicas de espécies de Lauraceae da Amazônia*. 2014. 166 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.
- SU, Y. C.; HO, C.L. Essential oil compositions and antimicrobial activities of various parts of *Litsea cubeba* from Taiwan. **Natural Product Communications**, vol. 11, n.4, p-515-518. 2016a.
- SU, Y. C.; HO, C.L. Composition of leaf essential oil of *Phoebe formosona* from Taiwan and its in vitro cytotoxic, antibacterial and antifungal activities. **Natural products Communications**, vol. 11, n.6 p. 845-848. 2016b.
- SU, X. Z.; LANE, K. D.; XIA, L.; SÁ, J. M.; WELLEMS, T. E. *Plasmodium* genomics and genetics: new insights into malaria pathogenesis, drug resistance, epidemiology, and evolution. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 32, n. 1, p. e00019. 2019.
- SUSAM – Secretaria Estadual de Saúde do Amazonas. Medicamento contra malária com a participação de pesquisadores da FMT-HVD é aprovado pela Anvisa. 2019. Disponível em: <http://www.saude.am.gov.br/visualizar-noticia.php?id=4043>. Acesso em: 01/11/2019.
- TAVARES, W. Antibióticos e quimioterápicos para o clínico. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2014. 712 p.
- TEIXEIRA, C. P. L. *Efeito antidepressivo da riparina II: investigação do mecanismo de ação através das alterações comportamentais, neuroquímicas e do estresse oxidativo*. 2013. 173f. Tese de Doutorado (Doutorado em Farmacologia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2013.
- TEIXEIRA, C. P. L.; MELO, C. T. V.; ARAÚJO, F. L. O.; CARVALHO, A. M. R.; SILVA, M. I. G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MACEDO, D. S.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, vol. 27, n.1, p. 129-137. 2013.
- TELASCREÂ, M. *Busca de substâncias antitumorais e antifúngicas através do estudo fitoquímico biomonitorado em *Cryptocaryas mandioccana* e *C. moschata* (Lauraceae)*. 2006. 236 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
- TELASCREÂ, M.; ASSONUMA, M. M.; AGRIPINO, D.; YOUNG, M. C. M.; CAVALHEIRO, A. J. *Substâncias fungitóxicas isoladas de folhas de *Cryptocarya moschata* e *C. aschersoniana* (Lauraceae)*. 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2005. Disponível em: [https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/38/111/38111204.pdf](https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/38/111/38111204.pdf). Acesso: 26 set. 2019.

- TIUMAN, T. S.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, vol. 15, n.8, p. e525-e532. 2011.
- TONG, C. Y. W.; ROSMARIN, C.; SEFTON, A.; *Tutorial Topics in Infection for the Combined Infection Training Programme*. 1ª. ed. Oxford University Press:Oxford, 2019. 512 p.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 12ª edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 2017. 964 p.
- TPL - The Plant List. *Lauraceae*. 2013. Version 1.1. Disponível em: <http://www.theplantlist.org> . Acesso em 06 mar. 2017.
- TRACY, J. W.; WEBSTER, L. T. Fármacos usados na quimioterapia das infecções por protozoários: Malária. In: LAURENCE, L. B.; LAZO, J.S.; PARKER, K. L. (eds.). *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. 11ª. ed. Nova Iorque: McGraw Hill, 2005. 1466 p.
- TREVIZOL, J. S.; MARTINS, B. L.; QUEIROZ-FERNANDES, G. M. Resistance to polymyxins in *Escherichia coli*. **Journal of Experimental and Clinical Microbiology**, vol. 1, n.1, p. 8-11. 2018.
- TURNER, D. N.; JUST, J.; DASARI, R.; SMITH, J. A.; BISSEMBER, A. C.; KORNIENKO, A.; ROGELJ, S. Activity of natural and synthetic polygodial derivatives against *Trypanosoma cruzi* amastigotes, trypomastigotes and epimastigotes. **Natural Product Research**, vol. 2019, n.1, p. 1-4. 2019.
- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal of Parasitology**, vol.31, n.5, p. 472-481. 2001.
- ULIANA, S. R. B., TRINCONI, C. T., & COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, vol. 145, n. 4, p. 464-480. 2017.
- VALGAS, C.; DE SOUZA, S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA, A.; Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 38, n.1, p. 369-380. 2007.
- VARELA, M. T.; FERNANDES, J. P. S. Natural Products: Key Prototypes to Drug Discovery Against Neglected Diseases Caused by Trypanosomatids. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 25, n. 00, p. 1-13. 2018.
- VENDRAMINI-COSTA, D. B.; SPINDOLA, H. M.; MELLO, G. C.; ANTUNES, E.; PILLI, R. A.; CARVALHO, J. E. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of racemic goniotalamin, a styryl lactone. **Life Sciences**, vol. 139, n. 1, p. 83-90. 2015.
- VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 49, n. 3, p.235-239. 2017.

- VILEGAS, J., LANÇAS., F. & VILEGAS, W. Composition of the volatile compounds from *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez. extracted by CO<sub>2</sub> in the supercritical state. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 7-8, n. 1, p. 13-19. 1998.
- VOLPATO, H.; DESOTI, V. C.; COGO, J.; PANICE, M. R.; SARRAGIOTTO, M. H.; SILVA, S. D. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. The Effects of N-Butyl-1-(4-imethylamino)phenyl-1,2,3,4- tetrahydro-carboline-3-carboxamide against *Leishmania amazonensis* Are mediated by mitochondrial dysfunction. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2013, n.1, p. 1–7. 2013.
- VON BULOW, M. V.; FRANCA, N. C.; GOTTLIEB, O. R.; SUAREZ, A. M. P.; Guianin: a neolignan from *Aniba guianensis*. **Phytochemistry**, vol. 12, n.7, p. 1805-1808. 1973.
- WALSH, C.; TIMOTHY, A. W. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. **The Journal of Antibiotics**, vol. 67, n.1, p. 7-22. 2013.
- WHO - World Health Organization. World malaria report 2012, Geneva: World Health Organization, 2012. 195 p.
- WHO, World Health Organization. World Malaria Report 2013. Geneva: World Health Organization,, 2013. 284 p.
- WHO - World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report and surveillance. Geneva: World Health Organization; 2014. 257 p.
- WHO - World Health Organization. 2015. World malaria report 2015. Geneva:World Health Organization. 280 p.
- WHO - World Health Organization. 2016. World malaria report 2016. Geneva:World Health Organization. 186 p.
- WHO - World Health Organization. 2017. Malaria fact sheet: world malaria day 2016. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>. Acesso em 02 ago. 2019.
- WHO - World Health Organization. 2019. Leishmaniasis – The disease and its epidemiology. Disponível em: [https://www.who.int/leishmaniasis/disease\\_epidemiology/en/](https://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/). Acesso em: 06 jul. 2019.
- WILKINSON, S. R.; TAYLOR, M. C.; HORN, D.; KELLY, J. M.; CHEESEMAN, I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 5022–5027. 2008.
- WONGSRICHANALAI, C.; PICKARD, A. L.; WERNSDORFER, W. H.; MESHNICK, S. R. Epidemiology of drug-resistant malaria. **The Lancet Infectious Diseases**, vol. 2, n.1 p. 209-218. 2002.

- WU, H.; SONG, Z.; HENTZER, M.; ANDERSEN J. B.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; HØIBY, N. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 53, n. 6, p. 1054–1061. 2004.
- WU, C. P.; HSIEH, C. H.; WU, Y. S. The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy. **Molecular Pharmaceutics**, vol. 8, n.6, p. 1996–2011. 2011.
- XU, G. G.; ZAIDI, S. A.; ZHANG, F.; SINGH, S.; RABORG, T. J.; YUAN, Y.; ZHANG, Y. Exploration on natural product anibamine side chain modification toward development of novel CCR5 antagonists and potential anti-prostate cancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 25, n. 17, p. 3721-3725. 2015.
- YADAV, J. S.; BHUNIA, D. C.; GANGANNA, B.; SINGH, V. K. First stereoselective total synthesis of cryptomoscatone E1 and synthesis of (+)-goniothalamine via an asymmetric acetate aldol reaction. **RSC Advances**, vol. 3, n. 1, p. 5254-5260. 2013.
- YAMAGUCHI, K. K. L.; ALCANTARA, J. M.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amazonica**, vol.42, n.4, p.541-546. 2012.
- YOUNGCHIM, S.; PORNSUWAN, S.; NOSANCHUK, J. D.; DANKAI, W.; VANITTANAKOM, N. Melanogenesis in dermatophyte species in vitro and during infection. **Microbiology**, vol. 157, n.1, p. 2348–2356. 2011.
- ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L. Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (LAURACEAE). **Química Nova**, vol. 30, n.1, p. 92-98. 2007.
- ZHANG, X. X.; ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Antibiotic resistance genes in water environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 82, n.3, p.397-414. 2009.
- ZHANG, Y.; ARNATT, C. K.; ZHANG, F.; WANG, J.; HANEY, K. M.; FANG, X. The potential role of anibamine, a natural product CCR5 antagonist, and its analogues as leads toward development of anti-ovarian cancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 22, n.1, p. 5093-5097. 2012a.
- ZHANG, F.; ARNATT, C. K.; HANEY, K. M.; FANG, H. C.; BAJACAN, J. E.; RICHARDSON, A. C.; WARE, J. L.; ZHANG, Y. Structure activity relationship studies of natural product chemokine receptor CCR5 antagonist anibamine toward the development of novel anti prostate cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 55, n.1, p. 395-408, 2012b.
- ZHENG, W.; SUN, W.; SIMEONOV, A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. **British Journal of Pharmacology**, vol. 175, n.1, p. 181–191, 2018.
- ZOHDI, R. M.; MUKHTAR, S. M.; BIHUDA, N. V.; RASOLA, N. E.; AHMADD, F. B.; AWANGE, K.; ISMAILA, N. H. In vivo Antiplasmodial and Toxicological

Effects of *Goniothalamus lanceolatus* Crude Extracts. **Natural Product Communications**, vol. 12, n. 8, p. 1251 – 1254. 2017.

## ANEXOS

### 1. Dados de deslocamentos químicos experimentais de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e HMBC da substância 1 (SILVA, 2018).

<b>Dados experimentais (500 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>)</b>			
<b>Posição do C</b>	<b><math>\delta_{\text{C}}</math> (ppm)</b>	<b><math>\delta_{\text{H}}</math> (ppm); multiplicidade; <i>J</i> (Hz)</b>	<b>HMBC <math>\delta_{\text{H}}</math> (ppm)</b>
2	163,9	-	5,50; 6,59
3	88,8	5,50; d; 2,2	5,95
4	171,0	-	3,83; 5,50; 5,95
5	101,3	5,95; d; 2,2	5,50; 6,59
6	158,6	-	5,95; 6,59; 7,50
7	118,6	6,59; d; 16,0	7,51; 5,95
8	135,8	7,50; m	6,59; 7,39; 7,50
9	135,2	-	7,39
10 e 14	127,4	7,50; m	7,50; 7,36
12	129,4	7,36; m	7,50
11 e 13	128,9	7,36; m	7,39
OMe	55,9	3,83; s	-

### 2. Dados de deslocamentos químicos experimentais de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e HMBC da substância 2 (SILVA, 2018).

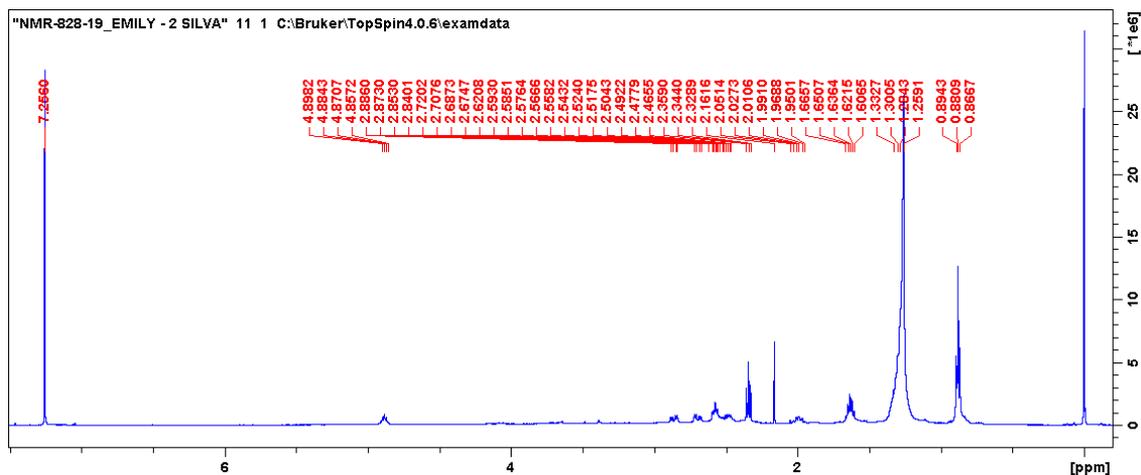
<b>Dados experimentais (500 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>)</b>			
<b>Posição do C</b>	<b><math>\delta_{\text{C}}</math> (ppm)</b>	<b><math>\delta_{\text{H}}</math> (ppm); multiplicidade; <i>J</i> (Hz)</b>	<b>HMBC <math>\delta_{\text{H}}</math> (ppm)</b>
2	164,1	-	5,47; 6,40
3	88,5	5,47; d; 2,2	3,82; 5,89
4	171,1	-	3,82; 5,47; 5,89
5	100,7	5,89; d; 2,2	3,82; 5,47; 6,40;
6	158,8	-	5,89; 6,40; 7,41;
7	116,8	6,40; d; 15,9	5,89; 7,41
8	135,5	7,41; d; 15,9	6,40; 6,97; 7,01
9	129,7	-	6,40; 6,81; 7,41
10	105,9	7,01; d; 1,6	6,81; 6,97; 7,41;
11	148,9	-	5,99; 6,81; 6,97; 7,01
12	148,3	-	5,99; 6,81; 6,97; 7,01
13	108,6	6,81; d; 8,0	6,97; 7,01
14	123,5	6,97; dd; 8,0; 1,6	6,81; 7,01; 7,41
OMe	55,9	3,82; s	-
OCH <sub>2</sub> O	101,4	5,99; s	-

**3. Dados de deslocamentos químicos experimentais de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HMBC da substância 3 (SILVA, 2018).**

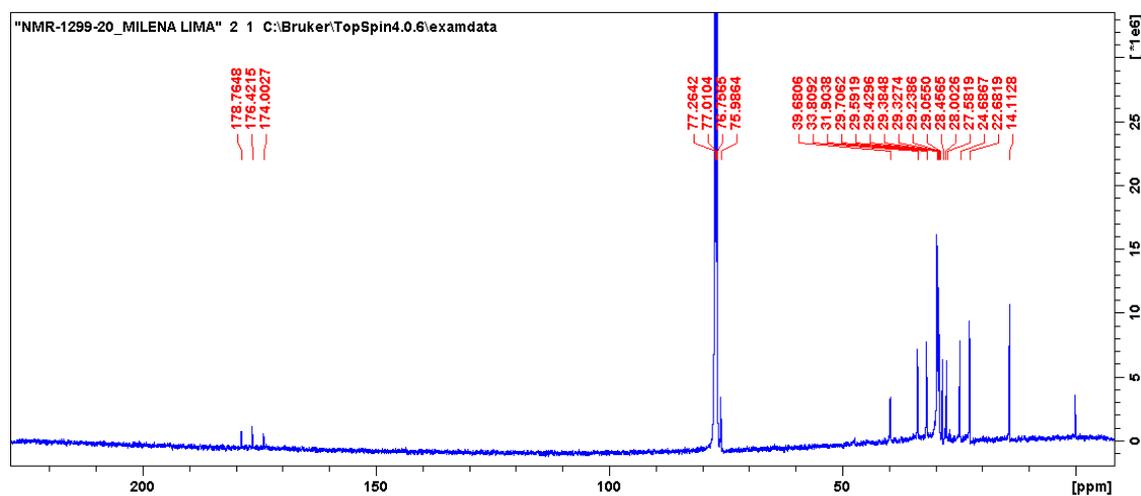
Dados Experimentais (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ )			
Posição do C	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm); multiplicidade; $J$ (Hz)	HMBC $\delta_{\text{H}}$ (ppm)
2	163,6	-	5,34
3	88,6	5,34; d; 2,2	3,72; 5,91
4	170,6	-	3,72; 5,34; 5,91;
5	102,8	5,91; d; 2,2	3,72; 5,34
6	158,6	-	5,91, 4,07; 4,31; 3,58
7	55,3	4,07; d; 10,8	4,31; 3,58; 5,91; 6,49
8	39,1	4,31; t; 10,2	4,07; 3,58; 5,30
9	128,3	-	4,31; 3,58; 4,07;
10	110,9	6,8; m	-
11	148,7	-	3,87
12	149,2	-	3,94
13	111,3	6,8; m	4,31
14	119,1	6,8; m	4,31
2'	164,7	-	5,30; 3,58
3'	91,6	5,30 s	3,34; 3,58;
4'	170,2	-	3,34; 5,30; 3,58; 4,31
5'	45,9	3,58; d; 10,1	5,30; 3,34; 4,31; 4,07; 6,49
6'	79,4	-	3,58; 4,31; 4,07; 5,30; 5,91; 6,49; 6,86;
7'	122,5	6,49; d; 15,8	4,07
8'	130,9	6,86; d; 15,8	6,49; 7,00; 6,93
9'	129,0	-	6,49; 6,86
10'	108,8	7,00; d; 1,9	6,83; 6,93
11'	148,9	-	-
12'	149,3	-	6,93; 7,00
13'	111,1	6,8; m	-
14'	120,3	6,93; dd; 8,3; 1,9	6,86; 7,00
OMe	56,0 (C-12'); 55,94 (C-11', C-11 e C-12); 55;91 (C4); 55,6 (C4')	3,88 (C-12'); 3,98 (C-11'); 3,94 (C-12); 3,87 (C-11); 3,72 (C-4); 3,34 (C-4')	-

#### 4. Espectros de RMN da substância 4.

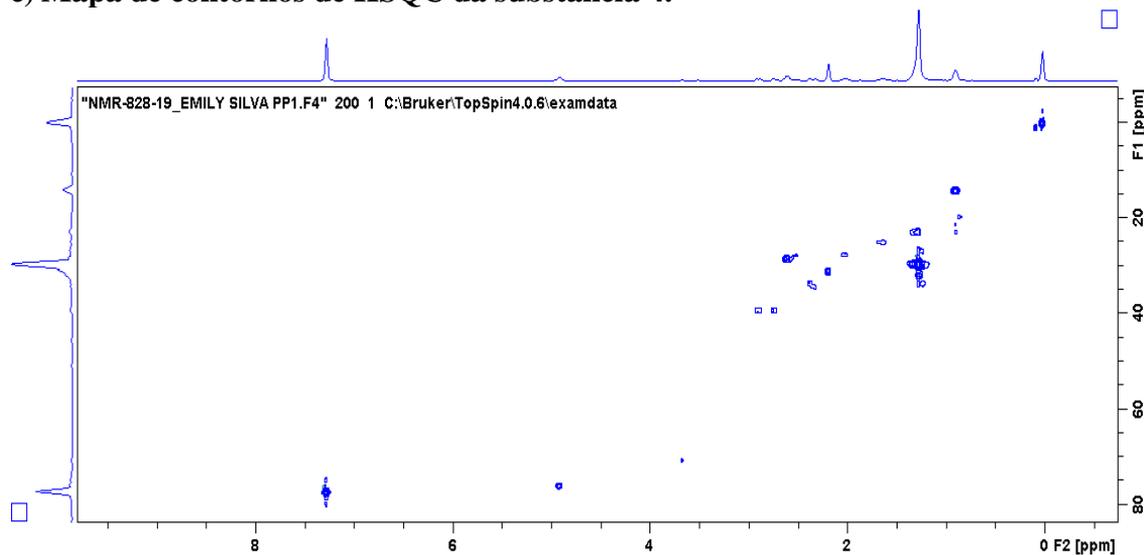
##### a) Visão geral do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância 4.



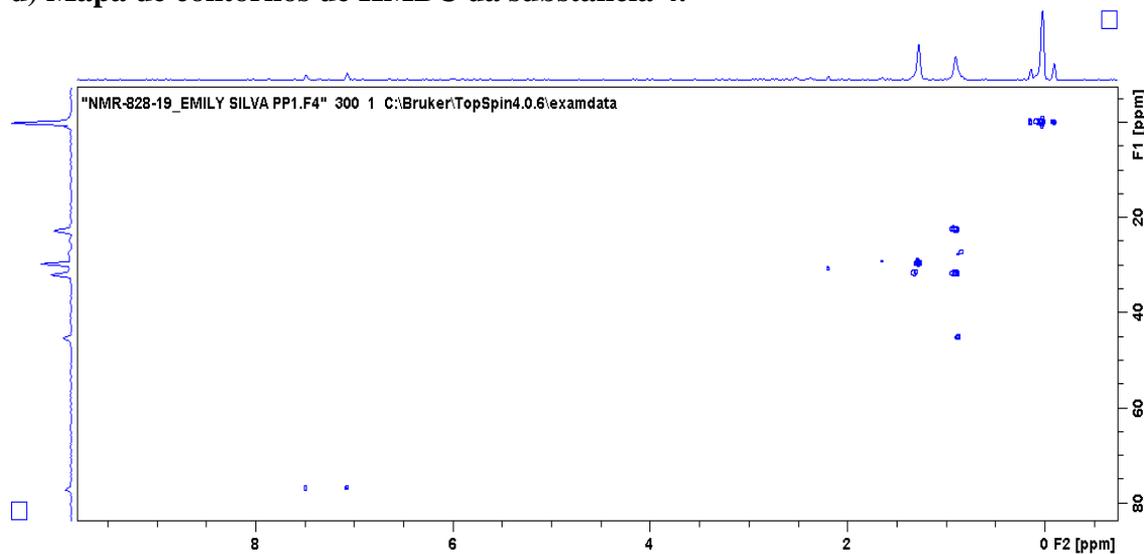
##### b) Visão geral do espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância 4.



**c) Mapa de contornos de HSQC da substância 4.**



**d) Mapa de contornos de HMBC da substância 4.**



**e) Mapa de contornos de COSY da substância 4.**

